

## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Infekcyjne zapalenie wsierdzia (IZW) może dotyczyć tzw. wsierdzia ściennego, które wyściela ściany przedsionków i komór lub wsierdzia zastawkowego, które wyściela powierzchnię zastawek. Zapalenie najczęściej rozwija się w części zastawkowej, głównie zastawki mitralnej.

IZW stanowi nadal poważną przyczynę zakażeń kardiologicznych powiązanych ze słabym rokowaniem oraz wysoką umieralnością. Częstość występowania IZW w populacji ogólnej wynosi ok. 3-10 przypadków/100 000/rok i zwiększa się wraz z wiekiem.

Obraz kliniczny IZW jest zróżnicowany w zależności od czynnika etiologicznego, współistniejącej choroby serca, rodzaju wszczepionych zastawki(ek) lub urządzeń do elektroterapii. Do wspólnych objawów IZW prawej i lewej strony serca należą niecharakterystyczne objawy przypominające zakażenie wirusem grypy takie jak: gorączka lub stan podgorączkowy, dreszcze, potliwość, osłabienie, brak apetytu, spadek masy ciała, bóle mięśni lub stawów. Objawy IZW przy zajęciu lewej części serca głównie obejmują: duszność i szmery nad sercem, które mają źródło w niedomykalności zastawki objętej zapaleniem, dolegliwości bólowe w klatce piersiowej, obrzęk płuc, drobne wybroczyny na skórze lub śluzówkach lub bolesne podskórne guzki z przejaśnieniami lub owrzodzeniem na palcach, udar mózgu lub zawał serca. Objawy charakterystyczne przy IZW prawej strony serca to objawy, które mogą przypominać zapalenie płuc, a nawet zatorowość płucną: kaszel, duszność i ból w klatce piersiowej. Charakterystyczną cechą patomorfologiczną IZ W obecnego na wsierdzu np. w badaniach echokardiografii są tzw. wegetacje w formie bezpostaciowej masy, w skład której wchodzi płytki krwi, mikroorganizmy oraz komórki zapalne.

Obecnie w klinicznym rozpoznawaniu IZW wykorzystuje się diagnostyczne kryteria opracowane przez Uniwersytet Duke'a. Potwierdzone IZW diagnozuje się u osób z uogólnionym zakażeniem potwierdzonym dodatnimi wynikami posiewów krwi, któremu towarzyszy zajęcie wsierdzia w badaniu obrazowym tj. echokardiografia lub rezonans magnetyczny. Pomocne w postawieniu diagnozy są również biochemiczne badania laboratoryjne (podwyższenie parametrów zapalnych).

Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi IZW (>90%) są zakażenia bakteryjne, wśród których dominują: gronkowce (ok. 60–80%), paciorkowce (ok. 30%), enterokoki (ok. 10%) oraz bakterie Gram-ujemne należące do grupy HACEK (*Haemophilus sp.*,

*Actinobacillus sp.*, *Cardiobacterium sp.*, *Eikenella sp.*, *Kingella sp.*). Przyjmuje się, że u ponad 10% pacjentów nie udaje się ustalić etiologii zakażenia. Pomimo postępu konwencjonalnej mikrobiologii związanego z dostępnością podłoży umożliwiających wykrycie szerszego zakresu różnych gatunków bakterii oraz wdrożenia automatycznych systemów wykrywania ich wzrostu, negatywne posiewy krwi w przypadkach podejrzeń IZW nadal stanowią ok. 5-69,7% wszystkich przypadków IZW. Najczęstszymi przyczynami ujemnych wyników posiewów krwi są: wdrożona antybiotykoterapia, zakażenia wywołane drobnoustrojami trudno-hodowlanymi na podłożach sztucznych (np. z grupy HACEK lub *Brucella sp.*) lub zakażenia wywołane drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi, nie poddającymi się hodowli na podłożach sztucznych (np. *Coxiella burnetii*, *Bartonella sp.*, *Chlamydia sp.*, *Tropheryma whipplei*). Odnotowywana wysoka częstość występowania ujemnych posiewów krwi lub fragmentów zastawek stanowi problem prawidłowego rozpoznania, terapii oraz prognozyki IZW.

Wyniki wielu badań wskazują, że około 99% mikroorganizmów zasiedlających poszczególne nisze różnych środowisk stanowią drobnoustroje nie poddające się hodowli, które nie mogą zostać wykryte klasycznymi metodami mikrobiologicznymi. Ostatnie 10 lat dynamicznego postępu naukowego w dziedzinie genomiki i proteomiki bakterii umożliwiło poznanie pełnych sekwencji genomów kilkuset wcześniej nieopisanych gatunków lub szczepów mikroorganizmów. Technologia sekwencjonowania następnej generacji (NGS) umożliwia bezpośrednie sekwencjonowanie lub charakterystykę genów i genomów obecnych w różnych ekosystemach i rewolucjonizuje m.in. wiedzę na temat gatunków drobnoustrojów jako czynników etiologicznych chorób, wcześniej niemożliwych do identyfikacji z zastosowaniem metod klasycznych.

W praktyce klinicznej coraz częściej wykorzystywane są metody biologii molekularnej w celu szybkiej identyfikacji drobnoustrojów trudnodowlanych, będących przyczyną ciężkich, zagrażających życiu zakażeń, w tym układu sercowo-naczyniowego.

Analiza sekwencji genów kodujących 16S rRNA jest uważana za najlepsze narzędzie filogenetyczne. Wykorzystując technikę NGS z zastosowaniem genu kodującego 16S rRNA można poddać szczegółowej analizie regiony zmienne, porównać ich sekwencje i odnaleźć różnicujące fragmenty lub pojedyncze nukleotydy, co pozwala na precyzyjną identyfikację gatunkową oraz wyodrębnienie nowych

gatunków, podgatunków lub szczepów bakterii. NGS regionów zmiennych genu kodującego 16S rRNA znajduje zastosowanie w m.in. rozpoznawaniu czynników etiologicznych IZW we krwi lub we fragmentach zastawek pobranych od pacjentów, u których uzyskano ujemne posiewy krwi i posiada potencjał do identyfikacji gatunków drobnoustrojów dotychczas poznanych oraz wcześniej nieopisanych jako czynniki etiologiczne IZW.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metodologii, walidacja i wdrożenie NGS fragmentów genu kodującego 16S rRNA na potrzeby analizy metagenomów obecnych w fragmentach zastawek lub krwi pacjentów z rozpoznaniem klinicznie IZW, poddanych zabiegom chirurgicznym oraz ocena przydatności zastosowania analizy metagenomów do wykrywania czynników etiologicznych IZW w odniesieniu do konwencjonalnych metod mikrobiologicznych.

Materiał biologiczny stanowiły zastawki lub ich fragmenty pobrane podczas zabiegów chirurgicznych od 73 pacjentów hospitalizowanych w Narodowym Instytucie Kardiologii - Państwowym Instytucie Badawczym (NIK-PIB): 63 osoby ze zdefiniowanym IZW oraz 10 pacjentów z wykluczonym IZW i operowanych z powodu innych zaburzeń serca.

Ze względu na brak zakładanej czułości oraz obecność inhibitorów reakcji PCR, bakteryjne DNA wyizolowane z krwi nie zostało zastosowane w analizach metagenomicznych. Jako materiał wyjściowy do badań metagenomicznych wykorzystano bakteryjne DNA wyizolowane z zastawek lub ich fragmentów, gdzie nie wykazano reakcji hamowania PCR. Wyizolowane bakteryjne DNA stanowiło matrycę do wykonania reakcji amplifikacji kwasów nukleinowych z zastosowaniem specyficznych starterów wyznaczonych w regionach zmiennych V3 i V4 genu kodującego 16S rRNA. Dalsze etapy NGS obejmowały przygotowanie bibliotek amplikonowych z użyciem zestawów Nextera (Illumina) oraz zaawansowaną analizę bioinformatyczną uzyskanych danych w celu identyfikacji taksonomicznej sekwencji genomów prokariotycznych.

Wśród badanej grupy 63 pobranych próbek krwi od chorych ze zdefiniowanym IZW, dodatkowo posiewy uzyskano w 16 przypadkach (25%). Ujemne posiewy krwi uzyskano w 47 przypadkach (75%). W grupie pacjentów z dodatnimi posiewami krwi gronkowce stanowiły 56,25%, paciorkowce - 25%, a pałeczki - 12,5%. Wśród 63 zastawek lub ich fragmentów pobranych od pacjentów ze zdefiniowanym IZW czynniki

etiologiczny IZW z zastosowanie badań metagenomicznych wykryto w 38 próbkach (60%).

W grupie 38 dodatnich wyników uzyskanych w badaniach metagenomicznych, paciorkowce stanowiły najliczniejszą grupę (31,6%). Następnie w kolejności zidentyfikowano pałeczki (21%), *B. quintana* (18,5%), gronkowce (13,16%) oraz enterokoki (13,16%). W 40% badanych próbek badania metagenomiczne nie wykazały obecności żadnego gatunku bakterii.

Przeprowadzone w pracy badania umożliwiły identyfikację aż 60% czynników etiologicznych IZW podczas gdy klasycznymi metodami mikrobiologii wykrywalność patogenów w posiewach krwi sięgała 25%, a w posiewach zastawek dodatnie wyniki uzyskano tylko w 14%. Wśród 47 ujemnych posiewów krwi, analiza metagenomiczna pozwoliła na gatunkową identyfikację DNA bakteryjnego w 25 fragmentach zastawek (53%). Z zastosowaniem techniki NGS fragmentu genu kodującego 16S rRNA wśród ujemnych posiewów krwi wykryto: 5 gatunków gronkowców: *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, 8 gatunków paciorkowców: *S. anginosus*, *S. mutans*, *S. constellatus*, *S. bovis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *L. rhamnosus*, *B. quintana*, *Neisseria* sp., *K. granulomatis*, *P. stutzeri*, *E. faecalis* oraz *G. adiacens*.

Analiza metagenomiczna fragmentów genu kodującego 16S rRNA pozwoliła na wykrycie czynników etiologicznych IZW, które nie zostały zidentyfikowane metodami klasycznej mikrobiologii oraz nie zostały powiązane w sposób systematyczny z IZW. Ponadto w pracy po raz pierwszy w Polsce zidentyfikowano *B. quintana* wśród pacjentów ze zdefiniowanym IZW, co pozwoliło na poprawę rokowania pacjentów poprzez włączenie celowanego leczenia.