

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Medicina

Programa de Doctorado 3139 Medicina



# Optimización del diagnóstico de la endocarditis infecciosa en un hospital terciario

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**Patricia Falomir Salcedo**

Dirigida por:

Dr. D. Francisco Javier Chorro Gascó

Dr. D. Francisco Marino Blanes Juliá

Dra. Dña. María Dolores Gómez Ruíz

Valencia, octubre 2022

**Dr. D. Francisco Javier Chorro Gascó**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universitat de València y Jefe del Servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

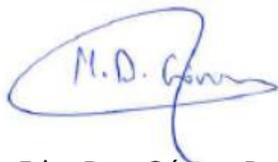
**Dr. D. Francisco Marino Blanes Juliá**, Médico Adjunto del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**Dra. Dña. María Dolores Gómez Ruíz**, Jefa de Sección del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**CERTIFICAN:**

Que **Dña. Patricia Falomir Salcedo**, Licenciada en Farmacia por la Universitat de València, ha realizado, bajo su dirección, la presente memoria titulada “Optimización del diagnóstico microbiológico de la endocarditis infecciosa en un hospital terciario”, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste, firman el presente certificado en Valencia, a 31 de octubre de 2022.



Fdo: Dra. Gómez Ruíz



Fdo: Dr. Blanes Juliá



Fdo: Dr. Chorro Gascó

## Agradecimientos

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital La Fe, por todo lo que he aprendido, por todo lo que me han enseñado desde mi residencia. A todos sin excepción, desde “la puerta” hasta “la PCR”, porque no creo que haya habido una sola persona a la que no haya mareado con las válvulas, los cultivos, los reactivos o cualquier otra cosa. Al personal administrativo, técnico, auxiliares y enfermería, residentes y adjuntos. Especialmente,

A las auxiliares y técnicos del turno y de biología molecular, por su disposición, por facilitarme el trabajo y por hacerme sonreír.

A Jose Luis López-Hontangas y a Lola Gómez, por permitirme llevar a cabo este proyecto y darme todas las facilidades para trabajar en el laboratorio, me he sentido muy afortunada.

A Jose Miguel Sahuquillo, por ayudar siempre sin esperar nada a cambio.

Al equipo de endocarditis y a los compañeros de Anatomía Patológica, especialmente a Ana Bel, Miguel Ángel Arnau y Nuria Mancheño, por su aportación a este trabajo.

A mis amigas, por su apoyo, su atención y su abrumadora confianza en mí.

A mis padres y a mis hermanos, porque son la base de mi vida y todo lo que se construye en ella.

A Marino Blanes y a Javier Chorro, porque sin ellos este trabajo nunca se hubiera escrito.

A todos, gracias de corazón.



## Resumen

La endocarditis infecciosa (EI) es una enfermedad de baja incidencia, diagnóstico complejo y elevada mortalidad que, a pesar de los avances tecnológicos, sigue constituyendo un reto tanto diagnóstico como terapéutico.

Uno de los pilares del diagnóstico etiológico es el hemocultivo, sin embargo, este puede ser negativo hasta en un 30% de los casos. Los métodos de diagnóstico moleculares son una importante alternativa para la identificación del agente causal. En pacientes sometidos a cirugía, la técnica molecular más estudiada es la PCR universal seguida de secuenciación, en la que se secuencia el material genético de bacterias y hongos presente en el tejido valvular.

El objetivo de este trabajo ha sido comprobar la validez de la PCR universal seguida de secuenciación, realizada directamente del tejido valvular, como parte de la rutina diagnóstica de la EI en un laboratorio de microbiología, y comparar los resultados con aquellos obtenidos por métodos clásicos.

Se realizó la PCR universal seguida de secuenciación en 102 muestras de 69 pacientes con sospecha o diagnóstico de EI según los criterios de Duke modificados, y en 43 muestras pertenecientes a 42 pacientes de un grupo control sin sospecha de infección. Por medio de esta técnica, se consiguió identificar el agente causal en 42 de los 52 pacientes con EI definitiva; en 39 casos coincidió con el resultado del hemocultivo y en dos casos coincidió únicamente con el resultado del cultivo de tejido valvular. En el paciente restante, todos los cultivos fueron negativos, pero se observaron cocos grampositivos en la tinción de Gram del tejido valvular, y se detectó *Streptococcus gallolyticus* mediante la PCR universal. Por otro lado, esta técnica fue negativa en 12 de los 15 pacientes del grupo de estudio con EI descartada y en todos los casos del grupo control. Se obtuvo una sensibilidad de 80,8% (IC 95%: 67-89,9), una especificidad de 98,2% (IC 95%: 89-99,9), un valor predictivo positivo de 97,7% (IC 95%: 89-99,9) y un valor predictivo negativo de 84,4% (IC 95%: 72,7-91,9). La eficiencia diagnóstica de la técnica fue de un 89,7%. En cuanto al diagnóstico clásico, el hemocultivo fue la técnica microbiológica que

presentó una mayor sensibilidad, 86,5% (IC 95%:73,6-94%), mientras que con el cultivo de válvula no se identificó el agente causal en el 71% de los casos. La tinción de Gram destacó por su elevado valor predictivo positivo, 100% (IC 95%: 74,7-100%). Se obtuvo un coeficiente kappa de 0,94 (concordancia de 97,2%), establecido como “concordancia casi perfecta” entre el diagnóstico clásico y molecular. Respecto al estudio anatomopatológico, en el 83,9% de los casos de EI definitiva se observaron en la muestra lesiones compatibles con el proceso infeccioso.

Así pues, la PCR universal seguida de secuenciación permitió identificar el agente causal, confirmar el diagnóstico etiológico en caso de discordancia entre los resultados de los cultivos de sangre y tejido valvular, y afianzar el diagnóstico en los pacientes con EI descartada. En tejido valvular, esta técnica presentó una sensibilidad significativamente mayor que el cultivo valvular, por lo se debería considerar su inclusión en los criterios diagnósticos vigentes. La tinción de Gram permitió valorar los resultados moleculares, teniendo en cuenta la persistencia de material genético de los microorganismos en el tejido. La realización del estudio anatomopatológico en tejido valvular también permitió valorar los resultados del diagnóstico microbiológico cuando existieron discordancias.

En una entidad tan compleja como la EI, es necesario utilizar todas las herramientas diagnósticas a nuestro alcance. Todas las áreas de diagnóstico de laboratorio son complementarias y no excluyentes y deberían ser valoradas conjuntamente.

## Índice

Abreviaturas.....	VII
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	XI
1    INTRODUCCIÓN .....	1
1.1    Definición y formas de presentación.....	2
1.2    Patogenia .....	3
1.3    Epidemiología .....	5
1.3.1    Incidencia.....	5
1.3.2    Mortalidad .....	8
1.3.3    Factores de riesgo.....	9
1.3.4    Sitio de adquisición.....	16
1.3.5    Agente causal.....	17
1.4    Diagnóstico .....	28
1.4.1    Clínica.....	30
1.4.2    Pruebas de imagen .....	32
1.4.3    Estudio anatomopatológico .....	37
1.5    Diagnóstico microbiológico clásico .....	38
1.5.1    Hemocultivo .....	38
1.5.2    Cultivo de válvula.....	39
1.5.3    Serología .....	40
1.6    Diagnóstico microbiológico molecular .....	40

1.6.1	PCR universal seguida de secuenciación .....	44
1.6.2	PCR específica .....	51
1.6.3	Limitaciones de las técnicas de diagnóstico molecular.....	52
1.7	Tratamiento y prevención .....	53
1.7.1	Importancia de las unidades de endocarditis .....	53
1.7.2	Tratamiento antibiótico.....	53
1.7.3	Tratamiento quirúrgico .....	55
1.7.4	Prevención .....	56
1.8	Perspectivas de futuro.....	58
1.8.1	Perspectivas en el diagnóstico microbiológico .....	58
1.8.2	Perspectivas en el diagnóstico clínico y tratamiento .....	59
2	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	61
2.1	Objetivo principal .....	63
2.2	Objetivos secundarios .....	63
3	MATERIAL Y METODOS.....	64
3.1	Tipo de estudio .....	65
3.2	Lugar de realización del estudio y características del centro.....	65
3.3	Población de estudio .....	65
3.4	Aspectos éticos .....	66
3.5	Recogida de datos .....	66
3.6	Diagnóstico microbiológico clásico .....	66
3.6.1	Hemocultivo .....	66
3.6.2	Cultivo del tejido valvular .....	67
3.6.3	Identificación y antibiograma.....	67

3.6.4	Estudio serológico .....	68
3.7	Diagnóstico microbiológico por métodos moleculares.....	68
3.7.1	Extracción de ADN a partir de tejido valvular .....	69
3.7.2	PCR de amplio espectro y secuenciación .....	71
3.7.3	PCR específicas .....	76
3.8	Criterios de contaminación .....	76
3.9	Análisis de datos .....	77
3.9.1	Análisis descriptivo .....	77
3.9.2	Análisis de concordancia .....	77
3.9.3	Análisis de los parámetros de validación .....	78
3.9.4	Análisis comparativo.....	79
4	RESULTADOS.....	80
4.1	Descripción de los pacientes y tipos de muestra .....	81
4.1.1	Descripción de los pacientes .....	81
4.1.2	Descripción de los tipos de muestra .....	84
4.2	Resultados del grupo de estudio .....	88
4.2.1	Diagnóstico microbiológico clásico del grupo de estudio .....	88
4.2.2	Diagnóstico microbiológico molecular del grupo de estudio.....	94
4.2.3	Comparación del diagnóstico microbiológico molecular con el diagnóstico microbiológico clásico. ....	99
4.2.4	Estudio anatomopatológico del grupo de estudio. Comparación con el diagnóstico microbiológico clásico y molecular .....	109
4.3	Resultados del grupo control .....	111
4.3.1	Diagnóstico microbiológico clásico del grupo control .....	111

4.3.2	Diagnóstico microbiológico molecular del grupo control .....	111
4.3.3	Estudio anatomopatológico del grupo control .....	111
4.4	Análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia.....	112
4.4.1	Sensibilidad y especificidad de las técnicas microbiológicas .....	112
4.4.2	Concordancia de las técnicas microbiológicas y el diagnóstico de EI .....	115
4.4.3	Análisis comparativo.....	116
5	DISCUSIÓN .....	117
5.1	Pacientes con Endocarditis Infecciosa definitiva.....	119
5.1.1	Edad y sexo .....	119
5.1.2	Tipo de muestra.....	120
5.1.3	PCR universal y secuenciación en pacientes con EI.....	121
5.1.4	PCR específicas .....	131
5.1.5	Diagnóstico microbiológico clásico y molecular en pacientes con EI .....	133
5.1.6	Diagnóstico histopatológico y microbiológico en pacientes con EI .....	145
5.2	Pacientes con Endocarditis Infecciosa posible .....	146
5.3	Pacientes sin Endocarditis Infecciosa .....	147
5.3.1	PCR universal y secuenciación en pacientes sin EI .....	147
5.3.2	Diagnostico microbiológico clásico y molecular en pacientes sin EI.....	149
5.3.3	Diagnóstico histopatológico y microbiológico en pacientes sin EI.....	150
6	CONCLUSIONES.....	151
7	BIBLIOGRAFÍA .....	154
8	<b>ANEXOS</b> .....	163
8.1	<b>Anexo 1. Datos de los pacientes del grupo de estudio</b> .....	164

## Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AHA: *American Heart Association*

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

CT: Ciclo umbral (del inglés *Cycle Threshold*)

dATP: Desoxiadenina trifosfato

dGTP: Desoxiguanina trifosfato

dCTP: Desoxicitosina trifosfato

dTTP: Desoxitimina trifosfato

dNTPs: Didesoxinucleótidos trifosfato

dNTPs: Didesoxinucleótidos trifosfato

EI: Endocarditis infecciosa

ESC: Sociedad Europea de Cardiología

ETE: Ecocardiografía transesofágica

ETT: Ecocardiografía transtorácica

FDG: Fluorodesoxiglucosa

GAMES: Grupo de apoyo al manejo de la endocarditis infecciosa en España

HACEK: *Haemophilus, Aggregatibacter, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella*

ICE: Colaboración Internacional sobre Endocarditis

ID-IRI: Iniciativa Internacional de Investigación de Enfermedades Infecciosas

NICE: *National Institute for Health and Clinical Excellence*

PB: Pares de bases

PET: Tomografía de Emisión de Positrones

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

STACN: Staphylococcus coagulasa negativa

TAVI: Implantación transcatéter de la válvula aórtica

SPECT: Tomografía computarizada por emisión de fotón único

TC: Tomografía computarizada

PET: Tomografía de emisión de positrones

UDVP: Usuarios de drogas por vía parenteral

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema propuesto para la patogenia de la endocarditis. Tomada de Mandell <i>et al.</i> <sup>1</sup> -----	4
Figura 2. Tendencias temporales de la incidencia bruta de EI (2000-2020). Tomada de Talha <i>et al.</i> <sup>9</sup> .-----	6
Figura 3. Tasa de incidencia de EI en España (2003-2014). Tomada de Olmos <i>et al.</i> <sup>12</sup> . -----	7
Figura 4. Incidencia de EI según edad y sexo. Adaptada de Cahill <sup>17</sup> .-----	11
Figura 5. Incidencia de EI según factores predisponentes cardíacos. Adaptada de Cahill <sup>17</sup> .-----	14
Figura 6. Distribución anual de los casos de EI en un centro de referencia de tercer nivel (1979-2014). Tomada de Mestres <i>et al.</i> <sup>23</sup> .-----	15
Figura 7. Algoritmo de diagnóstico de imagen de la EI según la Guía ESC 2015. Tomada de Habib <i>et al.</i> <sup>44</sup> .-----	36
Figura 8. Etapas de la reacción de la PCR. Tomada de Ramírez-Pacheco <i>et al.</i> <sup>59</sup> ----	42
Figura 9. Ilustración del proceso de PCR y detección del <i>amplicón</i> . Adaptada de Ramírez-Pacheco <i>et al.</i> <sup>59</sup> .-----	43
Figura 10. Esquema del gen que codifica el ARN ribosomal 16S. Tomada de Izquierdo <sup>67</sup> .-----	46
Figura 11. Ilustración del proceso de secuenciación Sanger o método por terminación de la cadena, en este ejemplo por adición de ddATP. Adaptada de Church <i>et al.</i> <sup>69</sup> .-----	48
Figura 12. Procesamiento del tejido valvular.-----	69
Figura 13. Distribución de la edad por sexo en los pacientes del grupo de estudio.	81
Figura 14. Clasificación del tipo de endocarditis en el grupo de estudio.-----	82
Figura 15. Distribución de la edad por sexo en los pacientes del grupo control. ---	83
Figura 16. Válvula afectada en los pacientes del grupo de estudio. -----	85
Figura 17. Tipo de válvula afectada en los pacientes del grupo de estudio. -----	85
Figura 18. Número de muestras por paciente.-----	87

Figura 19. Válvula afectada en los pacientes del grupo control. -----	87
Figura 20. Distribución de los resultados del hemocultivo por subgrupo de estudio. -----	88
Figura 21. Microorganismos aislados en el hemocultivo de pacientes con EI definitiva. -----	89
Figura 22. Distribución de los resultados del cultivo del tejido valvular por subgrupo de estudio. -----	90
Figura 23. Resultado de cultivo de tejido valvular por muestra en pacientes con EI definitiva. -----	91
Figura 24. Microorganismos aislados en el cultivo de tejido valvular en pacientes con EI definitiva. -----	92
Figura 25. Resultado de la técnica de PCR universal en cada subgrupo del grupo de estudio. -----	94
Figura 26. Microorganismos identificados por PCR universal en pacientes con EI definitiva. -----	95
Figura 27. Etiología de los casos de EI definitiva. -----	100
Figura 28. Resultados globales de las diferentes técnicas de diagnóstico microbiológico. -----	100
Figura 29. Resultados positivos por las diferentes técnicas diagnósticas y porcentaje de coincidencia con la PCR universal, el hemocultivo y el cultivo valvular en pacientes con EI definitiva. -----	101
Figura 30. Detalle por paciente de los resultados de las principales técnicas de diagnóstico empleadas en pacientes con EI definitiva. -----	102
Figura 31. Concordancia de los resultados positivos de la PCR universal y el hemocultivo en pacientes con EI definitiva. -----	103
Figura 32. Concordancia de los resultados positivos de la PCR universal, el cultivo de tejido valvular y el hemocultivo en pacientes con EI definitiva. -----	105

## Lista de tablas

Tabla 1. Distribución de los casos de EI por edad en distintos periodos de tiempo. Adaptada de Navas <i>et al</i> <sup>8</sup> . -----	11
Tabla 2. Agentes etiológicos de EI según el tipo de válvula. Adaptada de la Guía Mensa <sup>27</sup> . -----	18
Tabla 3. Agentes etiológicos de EI en función de la evolución de la enfermedad. Adaptada de la Guía Mensa <sup>27</sup> . -----	18
Tabla 4. Evolución de la distribución de los principales agentes causales de EI en el siglo XX. Tomada de Ambrosioni <i>et al</i> <sup>7</sup> . -----	19
Tabla 5. Evolución en la distribución de los principales agentes causales de EI a finales del siglo XX y comienzos del XXI. Tomada de Navas <i>et al</i> <sup>8</sup> . -----	20
Tabla 6. Criterios clínicos de Duke modificados. -----	29
Tabla 7. Manifestaciones clínicas de la EI. Tomada de Mandell <i>et al</i> <sup>1</sup> . -----	30
Tabla 8. Sensibilidad diagnóstica de la ecocardiografía transtorácica vs. transesofágica. -----	33
Tabla 9. Técnicas serológicas utilizadas. -----	68
Tabla 10. Genes diana y cebadores utilizados. -----	71
Tabla 11. Reactivos utilizados para la técnica de PCR. -----	73
Tabla 12. Escala de valoración del índice $\kappa$ -----	77
Tabla 13. Resultados de las distintas técnicas de microbiología según el subgrupo de estudio. -----	99
Tabla 14. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR universal (16S y 18S). -----	112
Tabla 15. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR universal 16S. -----	113
Tabla 16. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico clásico. -----	113
Tabla 17. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico clásico y molecular. -----	114
Tabla 18. Parámetros estadísticos del diagnóstico microbiológico clásico y molecular. -----	115

Tabla 19. Resultado positivo de la PCR universal según la duración del tratamiento antibiótico. -----	116
Tabla 20. Resultado positivo de la PCR universal según el análisis de una o más muestras por paciente. -----	116
Tabla 21. Microorganismos identificados por PCR universal, PCR específica o serología en pacientes con hemocultivo negativo. -----	141
Tabla 22. Valores de sensibilidad y especificidad de la PCR universal en diferentes estudios -----	144
Tabla 23. Pacientes con diagnóstico de EI definitiva. -----	164
Tabla 24. Pacientes con diagnóstico de EI posible. -----	167
Tabla 25. Pacientes con diagnóstico de EI descartada. -----	168

## **1 INTRODUCCIÓN**

### 1.1 Definición y formas de presentación

El término endocarditis infecciosa (EI) hace referencia a la infección de la membrana que recubre las cavidades del corazón, el endocardio, e implica la presencia de microorganismos en la lesión<sup>1</sup>. La infección afecta más comúnmente las válvulas, nativas o protésicas, pero también puede ocurrir sobre el endocardio mural, sobre los defectos del tabique cardíaco, en derivaciones arteriovenosas o arterioarteriales y en dispositivos intravasculares<sup>2</sup>.

Históricamente la EI se ha clasificado en tres grupos en función de la evolución de la enfermedad en ausencia de tratamiento: EI aguda, EI subaguda y EI crónica.

La forma aguda presenta una evolución fatal y el fallecimiento se produce en menos de 6 semanas. Cursa generalmente con fiebre alta, toxicidad sistémica y leucocitosis, y se suele asociar con la infección producida por *Staphylococcus aureus*. La forma subaguda (el fallecimiento se produce entre 6 semanas y 3 meses) y la forma crónica (la muerte tiene lugar después de 3 meses) suelen considerarse conjuntamente. En general, estas formas se producen en el contexto de una enfermedad valvular previa y se caracterizan por una evolución lenta, indolente, con febrícula, diaforesis nocturna, pérdida de peso y síntomas sistémicos vagos. La etiología clásica de la EI subaguda y crónica la constituyen los *Streptococcus* del grupo *viridans*.

Esta distinción basada en la progresión normal de la enfermedad sin tratamiento presenta un interés conceptual, pero no tiene en cuenta la superposición frecuente de las manifestaciones de la infección por algunos microorganismos, como por

ejemplo el género *Enterococcus*. Es preferible una clasificación basada en el agente etiológico, ya que esto nos proporciona mayor información acerca de la posibilidad de que exista una enfermedad cardíaca de base, la probable evolución de la enfermedad y los antimicrobianos más adecuados para su tratamiento<sup>1</sup>.

### 1.2 Patogenia

La patogenicidad de los microorganismos causantes de EI se fundamenta en su capacidad para adherirse, colonizar y persistir crónicamente en válvulas nativas o protésicas, formando vegetaciones sépticas. Este proceso es propiciado por la capacidad que presentan algunos microorganismos de formar una capa mucosa capaz de adherirse a los tejidos y a otros microorganismos. Dicha estructura recibe el nombre de biopelícula o *biofilm*<sup>3,4</sup>.

El *biofilm* es un destacado factor de virulencia, y representa un elemento clave en la patogenia de la endocarditis. Los mecanismos adoptados por los microorganismos para formar *biofilm* difieren mucho entre especies y condiciones ambientales. Aunque la composición y función de la matriz puede variar dependiendo del microorganismo que lo genere, algunos elementos son comunes. Por ejemplo, todos los *biofilm* contienen sustancias poliméricas extracelulares que consisten principalmente en polisacáridos, ADN extracelular, proteínas y lípidos, que mantienen unidas a las células bacterianas<sup>3,5</sup>.

La EI comienza como una lesión menor de la estructura de la superficie valvular. Estos cambios pueden producirse por diversas agresiones locales y sistémicas como

la turbulencia de la sangre o el propio microorganismo agresor. Estas alteraciones producen el depósito de plaquetas, fibronectina, fibrina y otros ligandos de matriz que forman la denominada vegetación estéril (las lesiones de la endocarditis trombótica no bacteriana).

Estos tejidos están potencialmente en riesgo de ser colonizados en el contexto de una bacteriemia transitoria. Algunas cepas tienen una ventaja selectiva para adherirse a las plaquetas, la fibronectina o la fibrina y producir la enfermedad. La producción de un *biofilm* por estos microorganismos permite su adherencia a las vegetaciones estériles. Tras la colonización, la superficie se cubre rápidamente con una capa protectora de fibrina y plaquetas que produce un entorno favorable para la multiplicación de los microorganismos. La interacción de estos fenómenos puede observarse en el esquema de la Figura 1 tomada de Mandell *et al*.<sup>1</sup>

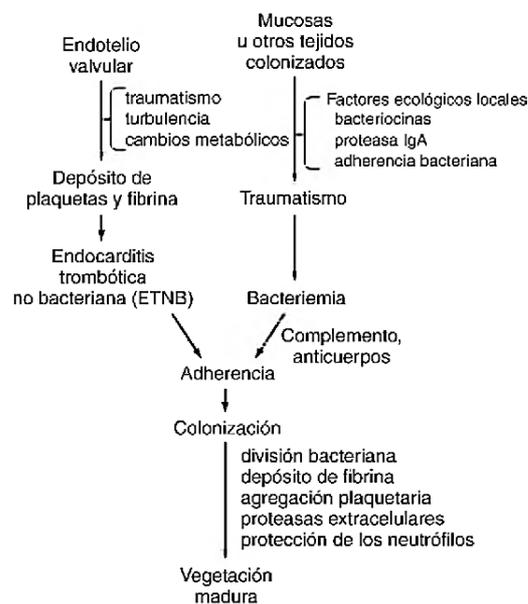


Figura 1. Esquema propuesto para la patogenia de la endocarditis. Tomada de Mandell *et al*.<sup>1</sup>

El *biofilm* estructurado dentro de la vegetación representa una barrera física y metabólica que proporciona al microorganismo protección frente a los antibióticos y las defensas inmunitarias del huésped. Esto explica por qué en ocasiones los tratamientos prolongados con altas dosis de antibióticos intravenosos no logran erradicar la infección y es necesario optar por el tratamiento quirúrgico<sup>1,3,6</sup>.

### 1.3 Epidemiología

La EI es una enfermedad grave de diagnóstico complejo, baja incidencia y elevada mortalidad. En lo que respecta al tipo de población afectada y al agente causal, la epidemiología de la EI ha sufrido importantes cambios en los países industrializados durante las últimas décadas<sup>1,7,8</sup>.

#### 1.3.1 Incidencia

La incidencia exacta de esta infección es difícil de determinar debido a la dificultad diagnóstica y al hecho de que la definición de caso varía en las diferentes publicaciones. Además, la mayoría de los estudios se realizan en hospitales de referencia o centros especializados en EI, lo que hace difícil extrapolar el número de casos a una población determinada. En cualquier caso, la EI se considera una infección poco frecuente, cuya incidencia, dependiendo de la publicación, oscila entre 1,5 y 15 casos por cada 100.000 habitantes, según recoge una reciente revisión bibliográfica<sup>2</sup>.

## 1. Introducción

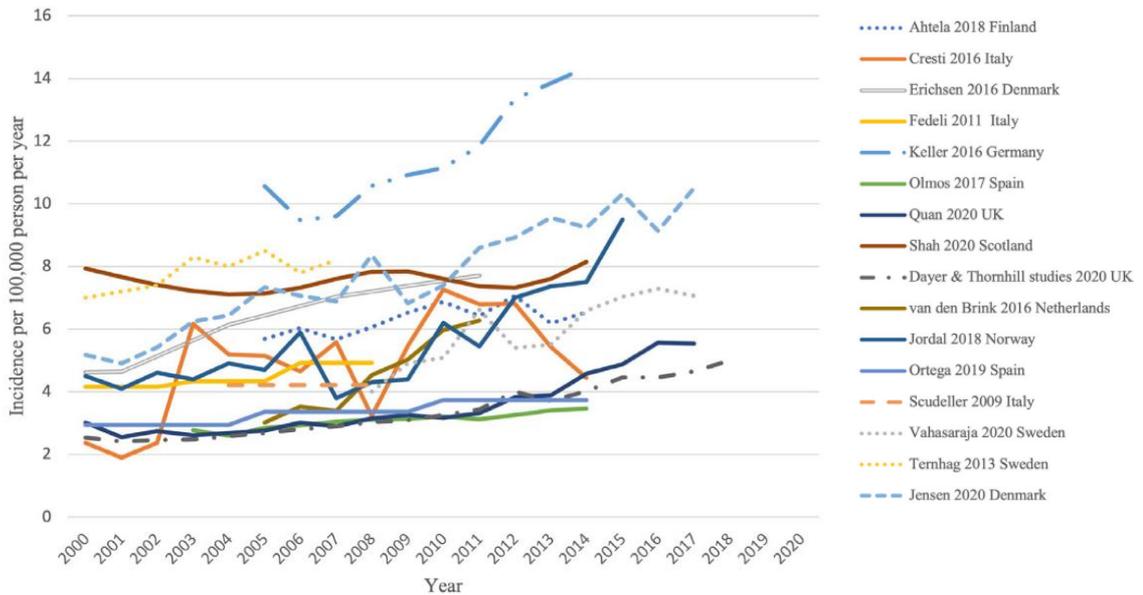


Figura 2. Tendencias temporales de la incidencia bruta de EI (2000-2020). Tomada de Talha *et al*<sup>9</sup>.

Cabe destacar que no se ha objetivado una disminución de la incidencia a lo largo de los años a pesar de los avances científicos, incluso se ha detectado un aumento paulatino desde el año 2000<sup>10</sup>. Una reciente revisión sistemática que incluye 18 estudios poblacionales llevados a cabo en países europeos entre 2000 y 2020, describe un aumento apreciable en la incidencia de EI en todas las publicaciones revisadas<sup>9</sup> (Figura 2).

Este incremento puede ser consecuencia de múltiples factores, entre los que se encuentran: (1) mejoras en el diagnóstico; (2) envejecimiento de la población y factores de riesgo asociados; y (3) mejoras en la práctica de codificación del diagnóstico de EI<sup>9</sup>.

## 1.3.1.1 Evolución de la incidencia en España

En el caso concreto de España, en la literatura se encuentran estudios que recogen datos de centros únicos durante largos periodos de tiempo, o bien estudios multicéntricos pero de menor duración, por lo que es difícil efectuar una aproximación de la incidencia global<sup>11</sup>.

Un estudio retrospectivo poblacional realizado entre 2003 y 2014 reveló que la incidencia de episodios de EI se incrementó significativamente durante el período de estudio, particularmente entre los adultos de mayor edad, aumentando de 2,72/100.000 habitantes en 2003 a 3,49/100.000 habitantes en 2014 (Figura 3). En este estudio los datos se recogieron de forma retrospectiva a través del Servicio Nacional de Salud<sup>12</sup>.

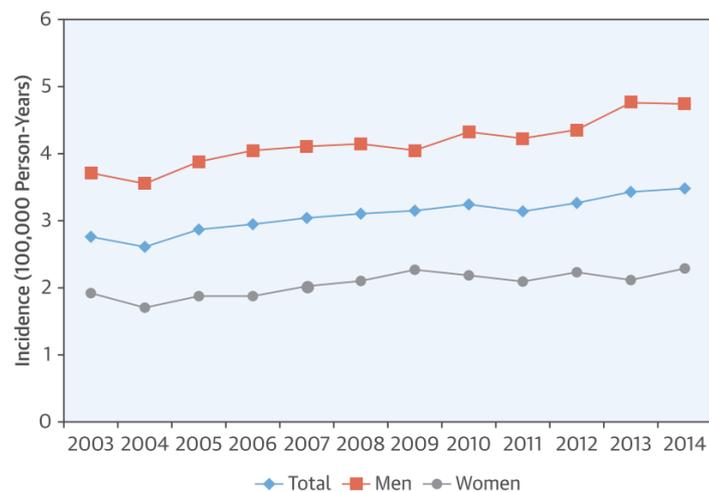


Figura 3. Tasa de incidencia de EI en España (2003-2014). Tomada de Olmos *et al*<sup>12</sup>.

En la revisión sistemática de Ortega-Loubon *et al.*, se comunicaron datos de incidencia para un período de tiempo similar (1997-2014) con un tamaño de

muestra mayor. Observaron una incidencia anual más alta, pero con una tendencia similar a la del estudio de Olmos<sup>13</sup>.

Estos resultados concuerdan con los publicados por el Grupo de Apoyo al Manejo de la Endocarditis Infecciosa en España (GAMES) de 2015, que señalan una incidencia de 3,5 casos de EI por cada 100.000 habitantes<sup>11</sup>. Se trata de un estudio prospectivo que abarca 4 años (de 2008 a 2012) y que recoge datos de 25 centros españoles que atienden a una población de 10.218.634 habitantes, lo que supone un 21,7% de la población española.

A nivel de la Comunidad Valenciana, hasta la fecha, no existen estudios de incidencia publicados como tal, pero cabe señalar que el Hospital General Universitario de Alicante colabora con el grupo GAMES<sup>11</sup> y el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia colabora con la Sociedad Europea de Cardiología (ESC)<sup>14</sup>.

### 1.3.2 Mortalidad

La mortalidad asociada a la EI se ha mantenido en torno al 20-25% en los últimos 10 años a pesar de los avances en la antibioterapia, en la cirugía, en las técnicas de imagen y en el diagnóstico microbiológico. Probablemente esto se deba al incremento de la edad de los pacientes y a la existencia de comorbilidades<sup>11</sup>. Los principales factores de riesgo asociados son: edad avanzada, índice de Charlson elevado, adquisición de EI en ambiente hospitalario, EI sobre válvula protésica, infección estafilocócica y la no realización de cirugía cuando está indicado<sup>2,11</sup>.

En el registro EURO-ENDO<sup>14</sup> publicado en 2019 por la Sociedad Europea de Cardiología, se detectó una mortalidad del 17,1%. En este trabajo prospectivo multicéntrico que se realizó entre 2016 y 2018, y que engloba 120 centros europeos y 36 centros no europeos, no se constató una mortalidad más elevada en pacientes con EI protésica o con dispositivos de estimulación cardiaca frente a pacientes con EI sobre válvula nativa. Por el contrario, sí que se detectó una mortalidad significativamente mayor en pacientes en los que estaba indicada la cirugía pero no se realizó<sup>14</sup>.

Otro estudio multinacional de 2019 detectó una mortalidad similar (17,5%). En este estudio, realizado entre 2015 y 2018, participaron 13 países de Europa y Asia y se recopilaron datos de 867 casos de EI a través de la Iniciativa Internacional de Investigación de Enfermedades Infecciosas (ID-IRI). En este caso la EI sobre válvula protésica sí que se mostró significativamente más mortal que la EI sobre válvula nativa <sup>15</sup>. En España, en el estudio GAMES de 2015 se describe una mortalidad global del 29% <sup>11</sup>.

Podemos afirmar, por tanto, la EI continúa presentando un mal pronóstico y es necesario un abordaje más agresivo para hacer frente a esta elevada mortalidad.

### 1.3.3 Factores de riesgo

Los cambios en los factores de riesgo de EI han influido profundamente en su epidemiología durante las últimas décadas. En el pasado, la EI se asociaba principalmente a individuos jóvenes con cardiopatía reumática y los principales microorganismos implicados eran el *Streptococci* del grupo *viridans*. Esta situación

se mantiene aún en los países en vías de desarrollo. Los individuos usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) también representaban una parte importante de los afectados, pero en este caso la EI se asociaba a *Staphylococcus aureus*<sup>7,8</sup>.

Actualmente en nuestro medio, afecta preferentemente a personas de edad avanzada con valvulopatías degenerativas, aunque también se ha detectado un incremento en pacientes sin enfermedad valvular aparente<sup>16</sup>, y los microorganismos aislados con mayor frecuencia son del género *Staphylococcus*.

### 1.3.3.1 Edad

El envejecimiento de la población conlleva un incremento de las enfermedades degenerativas valvulares y por tanto un aumento de la población susceptible de ser sometida a cirugía para reemplazo valvular. Esto se traduce en un incremento de población con factores de riesgo para presentar EI, tanto sobre válvula nativa como asociada a prótesis y otros dispositivos intracardiacos<sup>2</sup>. En general, la literatura señala un aumento en la edad de los pacientes con EI. En el estudio EURO-ENDO la edad media fue  $59,3 \pm 18$  años, pero esta fue significativamente superior en los pacientes de los países europeos que en los no europeos como Egipto o Turquía ( $61 \pm 17,4$  vs.  $52,66 \pm 19,01$ ). En España, según señala un estudio retrospectivo de 31 años que se llevó a cabo en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, el porcentaje de pacientes mayores de 60 años fue aumentando a lo largo de los años, como queda reflejado en la Tabla 1<sup>8</sup>.

Tabla 1. Distribución de los casos de EI por edad en distintos periodos de tiempo. Adaptada de Navas *et al*<sup>8</sup>.

	1985-1991	1992-1997	1998-2003	2004-2010	2011-2016	Total
<b>Edad</b>						
<15 años	5 (2,2%)	9 (4,2%)	5 (35,9%)	4 (1,6%)	1 (0,5%)	24 (24,3%)
15-30 años	113 (51,8%)	64 (30%)	9 (6,5%)	15 (6,2%)	5 (2,9%)	206 (20,9%)
30-60 años	76 (34,8%)	89 (41,8%)	53 (38,1%)	80 (32,9%)	43 (25%)	341 (34,6%)
>60 años	24 (11%)	51 (23,9%)	72 (51,8%)	144 (59,2%)	123 (71,5%)	414 (42%)

### 1.3.3.2 Sexo

En cuanto a la distribución por sexo, en la mayoría de estudios se describe una mayor frecuencia de EI en hombres. El porcentaje se sitúa en torno al 65%, y se mantiene constante a lo largo de los años como se refleja en la serie del Hospital Ramón y Cajal<sup>8</sup> y que apoyan otros tantos estudios<sup>11,12,14,15</sup>.

La Figura 4, adaptada de la revisión de Cahill<sup>17</sup>, refleja la incidencia de EI según edad y sexo que se describió en un estudio poblacional francés realizado por Selton-Suty *et al.* en 2012<sup>18</sup>. La incidencia alcanzó un máximo de 194 casos por millón en hombres de 75 a 79 años.

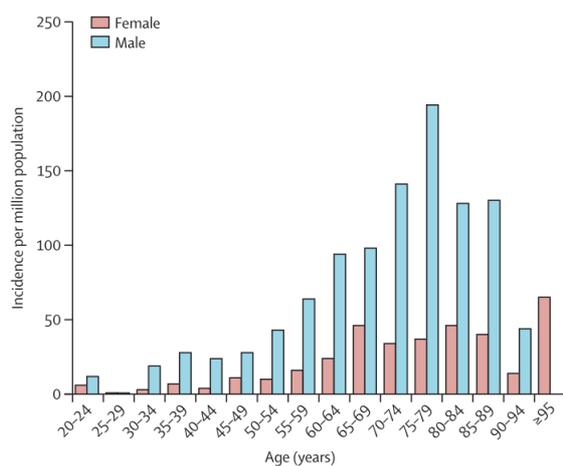


Figura 4. Incidencia de EI según edad y sexo. Adaptada de Cahill<sup>17</sup>.

### 1.3.3.3 Usuarios de droga por vía parenteral

Los casos asociados a UDVP han ido disminuyendo globalmente<sup>7,8</sup>. Sin embargo, algunas publicaciones informan de un aumento importante en algunas áreas de Norte América entre los años 2000 a 2013<sup>19</sup>. En Europa, un estudio retrospectivo realizado en Noruega también refiere que la proporción de UDVP con diagnóstico de EI aumentó del 16,5 al 23,5% desde 1996 hasta 2015<sup>20</sup>.

En el estudio EURO-ENDO, un 6,9% de las EI se asociaron a UDVP<sup>14</sup>. Se aprecia una disminución respecto a la cohorte publicada en 2009 por la “Colaboración Internacional sobre Endocarditis” (ICE), en la que este grupo representaba el 9,7%. Este estudio recogió de forma prospectiva datos de 2.781 pacientes con EI procedentes de 58 hospitales de 25 países entre 2000 y 2005.

En nuestro país, en el estudio del Hospital Ramón y Cajal<sup>8</sup> se observa una disminución drástica de EI sobre válvula nativa en UDVP; así, mientras que de 1985 a 1991 esta entidad representó el 54,1% de todas las EI, de 2011 a 2016 su presencia se redujo a un 3,5%. Este estudio a nivel local coincide con el estudio multicéntrico GAMES, que recoge datos de 2008 a 2012 y que describe una frecuencia de EI en UDVP del 2,9%<sup>11</sup>. La revisión de Olmos *et al.* también describe una disminución de los pacientes UDVP del 4,4% en 2003 al 1,1% en 2014<sup>12</sup>.

### 1.3.3.4 Cardiopatías estructurales

Casi todas las cardiopatías estructurales pueden predisponer a EI, sobre todo si el defecto produce turbulencias del flujo de sangre <sup>1</sup>.

### Cardiopatía reumática

La cardiopatía reumática es un factor predisponente que históricamente ha tenido mucha importancia en el desarrollo de EI. Históricamente, se manifestaba como lesión subyacente en el 37-76% de las EI, y en más del 85% de los casos afectaba a la válvula mitral<sup>1</sup>. En la actualidad esta entidad es menos frecuente en países industrializados donde su prevalencia ha disminuido hasta el 5% o menos en las últimas décadas <sup>1,7</sup>. Sin embargo, sigue siendo la alteración cardíaca predisponente más común en algunas regiones, fundamentalmente en países en vías de desarrollo <sup>1,21</sup>.

### Cardiopatías congénitas

Las principales cardiopatías congénitas asociadas con EI son el conducto arterioso permeable, la comunicación interventricular, la coartación de la aorta, la válvula aórtica bicúspide, la tetralogía de Fallot y, en ocasiones, la estenosis pulmonar. Se han descrito como responsables de la EI en un porcentaje de casos que oscila del 6% al 24%<sup>1</sup>. En el registro EURO-ENDO se describen cardiopatías congénitas como lesión subyacente en el 11,7% de los pacientes<sup>14</sup>.

### Lesiones cardíacas degenerativas

Las lesiones cardíacas degenerativas incluyen calcificación del anillo mitral, lesiones nodulares calcificadas secundarias a arteriosclerosis y trombo, y postinfarto de miocardio, entre otras. Su incidencia aumenta con la edad y, aunque no se conoce su contribución real al desarrollo de la EI, sí que se detecta una tendencia al alza<sup>1</sup>.

La Figura 5, adaptada de la revisión de Cahill<sup>17</sup>, refleja la distribución de EI según los factores cardíacos predisponentes que se observó en el estudio poblacional de Selton-Suty *et al*<sup>18</sup>.

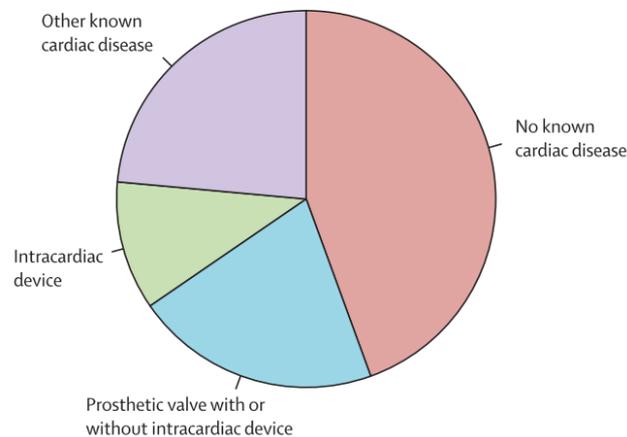


Figura 5. Incidencia de EI según factores predisponentes cardíacos. Adaptada de Cahill<sup>17</sup>.

### 1.3.3.5 Uso de dispositivos intravasculares

El incremento de las enfermedades degenerativas cardiovasculares que existe en la población envejecida de los países industrializados conlleva un aumento del uso de dispositivos intravasculares en sus diferentes modalidades: prótesis valvulares, dispositivos de estimulación intracardiaca o implantación transcatóter de la válvula aórtica (TAVI). Aunque la EI se describe con mayor frecuencia sobre válvula nativa, el incremento del uso de dispositivos intravasculares ha hecho que vaya aumentando la endocarditis relacionada con éstos, con el agravante de que la EI sobre válvula protésica se ha asociado con una mayor mortalidad<sup>15</sup>.

El estudio EURO-ENDO <sup>14</sup> de 2019 describe una proporción de EI protésica del 30,1% y de EI sobre dispositivo de estimulación intracardiaca del 9,9%. Estos datos

son más elevados que los publicados en el estudio ICE a principios de la década de los 2000, en el que los porcentajes se encontraban en torno al 21% y al 7% respectivamente<sup>22</sup>.

En España también se observa esta tendencia en la serie del Hospital Ramón y Cajal<sup>8</sup>. En este estudio valoran conjuntamente las EI sobre prótesis y sobre dispositivos de estimulación cardiaca, y detectan un incremento de su frecuencia con el tiempo. Las EI sobre prótesis y dispositivos representaron el 14,7 % de las totales entre 1985 y 1991, y este porcentaje aumentó hasta a un 45,3% entre 2011 y 2016.

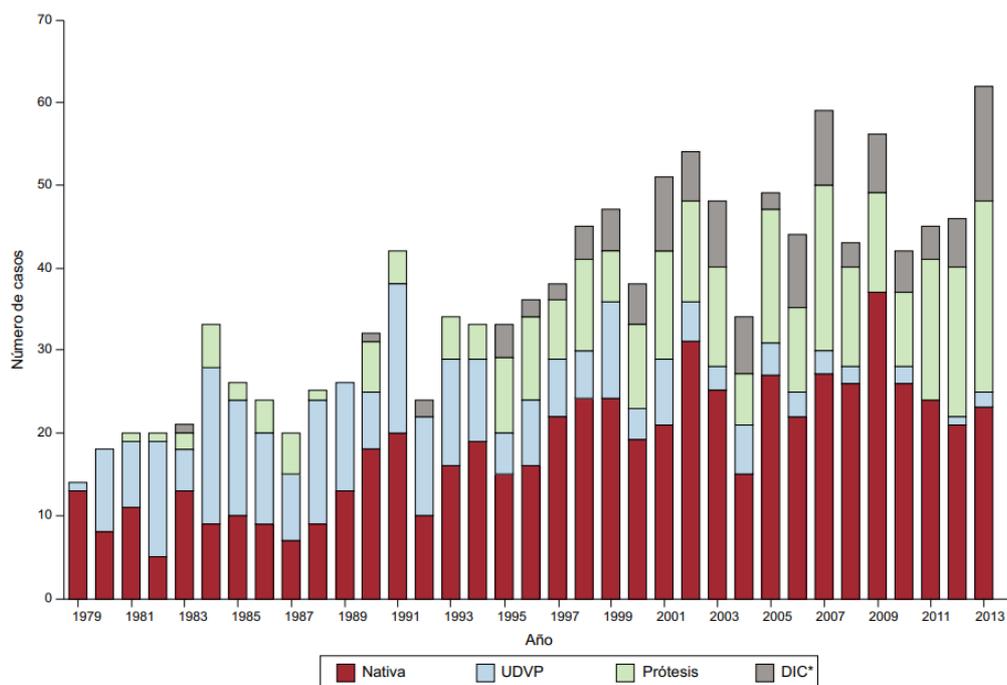


Figura 6. Distribución anual de los casos de EI en un centro de referencia de tercer nivel (1979-2014). Tomada de Mestres *et al*<sup>23</sup>.

DIC: dispositivos intracardíacos; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral.

La Figura 6 pertenece a la publicación de Mestres *et al.*<sup>23</sup>, que recoge la experiencia de 30 años en el Hospital Clínic de Barcelona. Refleja muy bien la evolución de la enfermedad, tanto por el incremento de la incidencia como por la variación en los factores de riesgo.

### 1.3.4 Sitio de adquisición

Respecto al lugar de adquisición, cabe diferenciar entre EI adquirida en la comunidad y EI relacionada con cuidados sanitarios, que puede ser nosocomial (en pacientes hospitalizados) o no nosocomial (en pacientes ambulatorios). La EI adquirida en la comunidad se relaciona fundamentalmente con procedimientos dentales invasivos, fiebre reumática y también con UDVP. Por otro lado, la EI relacionada con cuidados sanitarios puede afectar tanto a pacientes hospitalizados como ambulatorios sometidos a hemodiálisis o que sean portadores de prótesis valvulares, dispositivos de estimulación cardíaca, catéteres o TAVI<sup>24</sup>.

La EI adquirida en la comunidad es más frecuente que la asociada a cuidados sanitarios. Sin embargo, en los países industrializados en las últimas décadas se ha detectado una disminución importante de la EI relacionada con procedimientos dentales invasivos y fiebre reumática. Esto concuerda con el menor aislamiento de *Streptococci* del grupo *viridans* como agente causal de la EI, como se comentará más adelante<sup>7</sup>.

Paralelamente, ha aumentado la EI asociada al cuidado de la salud y en esta situación los agentes etiológicos más habituales son estafilococos y enterococos<sup>7,25,26</sup>.

En el estudio ICE de 2009, la EI asociada a la atención sanitaria constituía el 23% de los casos (nosocomial 14% / no nosocomial 9%)<sup>22</sup>. En el registro EURO-ENDO de 2019 se constata un incremento de esta presentación hasta aproximadamente el 30% de los casos (nosocomial 18,2% / no nosocomial 11,8%), y se indica que no se advirtieron diferencias significativas entre pacientes de países europeos y no europeos<sup>14</sup>. Hay que destacar que, según el estudio ICE, en América del Norte la proporción de EI asociada al cuidado sanitario ya representaba un 37% en 2009<sup>22</sup>. En España, según la cohorte GAMES de 2015, la EI adquirida en la comunidad continúa siendo la más frecuente (58,8%), y la EI asociada a cuidados sanitarios representa un 37,1% de los casos (nosocomial 28,1% / no nosocomial 9%)<sup>11</sup>.

### 1.3.5 Agente causal

El espectro de microorganismos causantes de EI es amplio y varía dependiendo de la forma de presentación, sin embargo, en aproximadamente el 80% de los casos se asocia a cocos grampositivos de los géneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp., como reflejan destacados estudios poblacionales como el del grupo GAMES, EURO-ENDO, ID-IRI e ICE<sup>11,14,15,22</sup>.

En la Tabla 2, adaptada de la Guía Mensa<sup>27</sup>, se clasifican los agentes causales de EI según su frecuencia y su asociación al tipo de válvula (nativa o protésica) o dispositivo, y a la presentación precoz o tardía respecto al momento del reemplazo valvular. También recoge los microorganismos asociados a EI en UDVP.

Tabla 2. Agentes etiológicos de EI según el tipo de válvula. Adaptada de la Guía Mensa<sup>27</sup>.

	<b>Infección de válvula nativa o infección tardía (&gt; 1 año) de válvula protésica</b>	<b>Infección en el paciente UDVP</b>	<b>Infección precoz (&lt; 1 año) de válvula protésica o de cable de marcapasos</b>
<b>Frecuentes</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	STACN <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Menos frecuentes o raros</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus gallolyticus</i> STACN <i>Abiotrophia</i> spp. <i>Granulicatella</i> spp Grupo HACEK <i>Coxiella burnetii</i> Otras bacterias	<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i> <i>Streptococcus</i> betahemolíticos STACN <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacterias Otras bacterias <i>Candida</i> spp	<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Cutibacterium</i> Enterobacterias Otras bacterias <i>Candida</i> spp <i>Aspergillus</i> spp

Abreviaturas: STACN= *Staphylococcus* coagulasa negativa; HACEK: *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*.

Como se ha comentado, determinados microorganismos se asocian a una progresión más fulminante de la enfermedad. En la Tabla 3 se clasifican los agentes causales en función de la evolución de la EI (aguda vs. subaguda o crónica).

Tabla 3. Agentes etiológicos de EI en función de la evolución de la enfermedad. Adaptada de la Guía Mensa<sup>27</sup>.

<b>EI aguda</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Streptococcus</i> betahemolíticos y <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus</i> spp
<b>EI subaguda/ crónica</b>	<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i> STACN (distintos de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> ) <i>Enterococcus</i> spp Grupo HACEK <i>Granulicatella</i> spp A veces <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bartonella</i> spp., <i>Tropheryma whipplei</i> y <i>Coxiella burnetii</i> pueden evolucionar de forma muy lenta (meses, años)

Abreviaturas: STACN= *Staphylococcus* coagulasa negativa; HACEK: *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*

El cambio en los factores de riesgo en los países más industrializados ha conllevado un cambio en el principal agente causal de la EI en la que el género *Streptococcus* ha cedido su puesto al *Staphylococcus aureus*. También ha aumentado la EI causada por *Enterococcus* spp. y estafilococos coagulasa-negativa (STACN), sobre todo asociada a ambiente hospitalario y el uso de dispositivos intravasculares<sup>1,7</sup>.

En la Tabla 4, perteneciente a la publicación de Ambrosioni *et al.*, se refleja la evolución en la distribución de los principales agentes causales de EI a lo largo del siglo XX en la que se evidencia el cambio de paradigma etiológico. Esta revisión incluye fundamentalmente países europeos, aunque también recoge estudios de Estados Unidos y de Túnez<sup>7</sup>.

Tabla 4. Evolución de la distribución de los principales agentes causales de EI en el siglo XX. Tomada de Ambrosioni *et al.*<sup>7</sup>.

Period	VGS (%)	Other streptococci <sup>a</sup> and enterococci	<i>S. aureus</i> (%)	CoNS (%)	Gram Negative <sup>b</sup> (%)	Other/culture negative (%)
Prior to 1970	44	13%	14	4	3	22
1970s	43	15%	13	3	8	18
1980s	29	19%	24	9	8	15
1990s	27	14%/9%	28	7	5	10
After 2000	16	9%/10%	31	11	9	14

Abreviaturas: VGS= *Streptococcus* grupo *viridans* CoNS= *Staphylococcus* coagulasa negativa.  
<sup>a</sup>Incluye *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos, *Streptococcus bovis* (*gallolyticus*), *Granulicatella* y *Abiotrophia* spp. y *Enterococcus* spp. hasta 1984. <sup>b</sup>Incluye HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*) y otros gramnegativos.

Tabla 5. Evolución en la distribución de los principales agentes causales de EI a finales del siglo XX y comienzos del XXI. Tomada de Navas *et al*<sup>8</sup>.

	1985-1991	1992-1997	1998-2003	2004-2010	2011-2016	Total
<i>S. aureus</i>	101 46,33%	108 50,70%	42 30,22%	70 28,81%	46 26,74%	367 (37,2%)
SCN <sup>1</sup>	17 7,80%	20 9,39%	33 23,74%	40 16,46%	31 18,02%	141 (14,3%)
<i>S. viridans</i>	39 17,89%	32 15,02%	14 10,07%	29 11,93%	16 9,30%	130 (13,2%)
<i>S. bovis</i>	2 0,92%	6 2,82%	3 2,16%	17 7,00%	14 8,14%	42 (4,3%)
Enterococos	12 5,50%	8 3,76%	13 9,35%	34 13,99%	22 12,79%	89 (9%)
BGN <sup>2</sup> /Otros	17 7,80%	12 5,63%	15 10,79%	18 7,41%	20 11,63%	82 (8,3%)
Hongos	2 0,92%	6 2,82%	2 1,44%	5 2,06%	2 1,16%	17 (1,7%)
Polimicrobianas	8 3,67%	7 3,29%	5 3,60%	4 1,65%	7 4,07%	31 (3,1%)

Abreviaturas: SCN= *Staphylococcus* coagulasa negativa; BGN= Bacilo gramnegativo

#### 1.3.5.1 *Streptococcus* grupo *viridans*

Como se ha señalado, en un inicio la EI se asociaba principalmente a individuos con fiebre reumática o a la práctica de intervenciones dentales invasivas, y los principales microorganismos implicados eran *Streptococci* del grupo *viridans*. Esta situación se mantiene en los países en vías de desarrollo<sup>7,22</sup>. En nuestro medio la endocarditis estreptocócica es menos frecuente. Algunos estudios indican un repunte de los casos por estreptococos desde el año 2000 y se cuestiona si puede ser debido a la modificación en las indicaciones de profilaxis introducida en las guías en 2007<sup>17</sup>. Sin embargo, en el registro EURO-ENDO de 2019, no se detecta esta tendencia y se objetiva una disminución de los casos de EI por estos microorganismos respecto a otros estudios de principios de siglo como el del ICE (12% vs 17%)<sup>14,22</sup>. Por su parte, en el estudio poblacional ID-IRI también de 2019,

los *Streptococci* del grupo *viridans* representan un 18,7%, aunque cabe destacar que en esta cohorte Turquíá aporta 322 de los 867 pacientes<sup>15</sup>.

En España, la frecuencia de EI por *Streptococci* del grupo *viridans* ha ido disminuyendo, como queda reflejado en la Tabla 5, tomada del estudio del Hospital Ramón y Cajal<sup>8</sup>. En el estudio GAMES de 2015, el porcentaje de EI por este grupo de microorganismos fue del 12%<sup>8</sup>.

### 1.3.5.2 *Enterococcus* spp.

En los últimos años, la EI por este género ha adquirido mayor importancia. La especie *Enterococcus faecalis* causa aproximadamente el 90% de los casos de endocarditis enterocócica y afecta fundamentalmente a pacientes varones añosos que presentan numerosas comorbilidades. La adquisición asociada a la atención médica es cada vez más importante y cabe destacar que la EI por *Enterococcus faecalis* es la más común en las infecciones relacionadas con TAVI, según indica una revisión reciente de Fernández-Hidalgo *et al*<sup>28</sup>. También describen un aumento de los estudios que relacionan la EI por *Enterococcus faecalis* con las neoplasias colorrectales, aunque se necesitan más estudios para validar estos hallazgos preliminares.

La EI por *Enterococcus* spp. se sitúa en general como tercera causa de EI, por detrás de *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. En la publicación del grupo ICE de 2009 la proporción de *Enterococcus* spp. se encontraba en torno a un 10%<sup>22</sup>. Sin embargo, en estudios poblacionales más recientes como EURO-ENDO o el estudio ID-IRI, la representación de los enterococos ha aumentado a un 15.8% y un 16,1%,

respectivamente<sup>14,15</sup>. En España también se observa esta tendencia a lo largo de las décadas, como muestra estudio del Hospital Ramón y Cajal (Tabla 5)<sup>8</sup>. En la serie GAMES de 2015 los enterococos representan un 12,7% del total de las EI<sup>11</sup>.

### 1.3.5.3 *Streptococcus* grupo *gallolyticus* (*bovis*)

Respecto a este grupo de microorganismos, la subespecie que más se asocia a la EI es *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, y se observa particularmente en pacientes con neoplasia de colon<sup>29,30</sup>.

La nomenclatura de este grupo de estreptococos ha sufrido modificaciones en las últimas décadas en base a divergencias bioquímicas, moleculares y genéticas. Todavía está sujeta a debate y aún no ha sido adoptada universalmente. Según los análisis genéticos más recientes<sup>30</sup>, este grupo incluye siete divisiones: (1) *Streptococcus equinus*, (2) *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*, (3) *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, (4) *Streptococcus alactolyticus*, (5) *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, (6) *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* y (7) *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus*.

En algunos de los estudios revisados en el presente trabajo, se hace alusión a este grupo de forma global como *Streptococcus* grupo *bovis*, mientras que en otros se identifica la especie o subespecie concreta.

Según la bibliografía, la EI causada por *Streptococcus* grupo *bovis* también ha aumentado en los últimos años, como queda reflejado en el trabajo del Hospital Ramon y Cajal (Tabla 5)<sup>8</sup>. En esta serie se describe una proporción de EI por *Streptococcus* grupo *bovis* del 0,92% en la década de los 80 del pasado siglo, que

aumenta hasta el 8% en el periodo de estudio más reciente. En el registro EURO-ENDO de 2019<sup>14</sup>, se recoge una proporción de EI por *Streptococcus gallolyticus* del 6.6%, que coincide con la cohorte del grupo GAMES<sup>11</sup>, que describe una proporción de EI por *Streptococcus grupo bovis* de un 6,4%.

### 1.3.5.4 *Staphylococcus* spp.

En la actualidad el género *Staphylococcus* constituye el principal agente causal de EI en nuestro medio<sup>7,11</sup>. Como se ha comentado, el envejecimiento de la población conlleva un incremento de las necesidades sanitarias que se traduce en un mayor uso de prótesis valvulares y dispositivos intravasculares. En este contexto el principal organismo implicado en la EI es el *Staphylococcus* spp., y se ha detectado un aumento de su aislamiento a lo largo de los años, como refleja la Tabla 4 adaptada de la publicación de Ambrosioni<sup>7</sup>.

*Staphylococcus aureus* es el principal agente causal de EI sobre válvula nativa; en el estudio ID-IRI de 2019<sup>15</sup>, las EI por *Staphylococcus* spp. representaron el 40% y se observó una asociación entre *Staphylococcus aureus* y EI sobre válvula nativa significativamente mayor que sobre válvula protésica (36.4% vs. 22.3%; p=0,0001).

En el registro EURO-ENDO de 2019<sup>14</sup>, en el 44.1% de los pacientes también se aisló *Staphylococcus* spp. Respecto a *Staphylococcus aureus*, señalan que se detectó un mayor porcentaje de cepas meticilin resistentes en países europeos que en no europeos (25,7 vs. 17,7%; p=0.0002).

En la serie del Hospital Ramón Cajal, sin embargo, se aprecia una disminución del *Staphylococcus aureus* a lo largo de las décadas, como muestra la Tabla 5. Este

descenso va ligado al descenso en España de los pacientes UDVP, ya que *Staphylococcus aureus* supone el principal agente en este caso. En la última década, pese a que la EI en pacientes adictos se ha convertido en un hecho excepcional, la infección estafilocócica sigue siendo predominante, tanto a nivel comunitario como nosocomial<sup>8</sup>.

En la serie del grupo GAMES<sup>11</sup>, el género *Staphylococcus* constituye el 40,3% de las EI. De estos, el 23,6% pertenece a la especie *Staphylococcus aureus*. Señalan además que la mayoría de los aislamientos fueron sensibles a meticilina (84.5%). Estos datos concuerdan con los publicados en la serie del Ramón y Cajal en la década de los 2000<sup>8</sup>, como muestra la Tabla 5.

### 1.3.5.5 Etiologías menos frecuentes

Alrededor del 10% de las EI están producidas por un grupo heterogéneo de bacterias exigentes, de difícil crecimiento, alguna de las cuales son causantes de zoonosis. Los hongos y las levaduras también son agentes etiológicos de EI poco frecuentes<sup>6,11,15</sup>.

#### HACEK

El grupo de bacterias HACEK: *Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens* y *Kingella* spp., constituye un grupo de bacterias gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales, que forman parte de la microbiota normal del tracto respiratorio superior y oral en humanos. Aunque su patogenicidad es limitada, son responsables del 1-3% de todas las EI. Se caracterizan por causar una infección de curso insidioso en el que los síntomas

pueden tardar en aparecer, por lo que el diagnóstico se suele retrasar. Dentro de este grupo, *Haemophilus parainfluenzae* es la causa más común de EI<sup>31</sup>.

### *Coxiella burnetii*

*Coxiella burnetii* es un cocobacilo gramnegativo intracelular que no se aísla en los medios habituales de cultivo microbiológico. Es el agente causal de la fiebre Q, que es una zoonosis; el ser humano se infecta al inhalar sus formas de resistencia (esporas) procedentes de fluidos o productos patológicos de animales subclínicamente infectados, fundamentalmente ganado.

Las infecciones cardiovasculares son una de las principales complicaciones graves de la fiebre Q aguda<sup>32</sup>. El porcentaje de EI causadas por este microorganismo se encuentra en torno al 1%, como se describe en el registro EURO-ENDO (0,8%) o en el estudio ID-IRI (1%)<sup>14,15</sup>.

### *Tropheryma whipplei*

*Tropheryma whipplei* es una bacteria grampositiva intracelular que tampoco es capaz de crecer en los medios de cultivo microbiológicos habituales. Es muy ubicua, estando presente en el suelo, agua potable y aguas residuales<sup>33</sup>. Se ha relacionado con diferentes formas clínicas, la más habitual es la enfermedad de *Whipple* clásica, que afecta principalmente al sistema gastrointestinal. La EI por este microorganismo es una entidad clínica emergente observada en personas de mediana edad y pacientes varones añosos que presentan artralgias<sup>34</sup>.

### Bartonella spp.

El género *Bartonella* está formado por bacilos gramnegativos exigentes de crecimiento lento, aerobios o microaerófilos, que crecen con dificultad en los medios de cultivo microbiológicos habituales. En general, son agentes etiológicos de zoonosis (excepto *Bartonella quintana* y *Bartonella baciliformes*) y se transmiten a través de artrópodos vectores. Provocan diversos síndromes clínicos en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, entre los cuales se encuentra la EI de carácter subagudo o crónico. La mayoría de los casos de EI se asocian con *Bartonella quintana*, relacionada principalmente con personas sin hogar infestadas de piojos del cuerpo, y a *Bartonella henselae*, agente causal de la enfermedad por arañazo de gato, y que se asocia a pacientes con valvulopatía previa y contacto con gatos<sup>35,36</sup>.

En las últimas décadas ha aumentado la comunicación de casos de EI por *Bartonella*, pero algunos autores indican que no hay un aumento real en la incidencia, sino que se debe a una mejora de las técnicas diagnósticas<sup>35</sup>.

### Hongos

La endocarditis fúngica es una entidad infrecuente pero emergente que representa del 2% al 4% de todos los casos de EI. Afecta fundamentalmente a pacientes inmunodeprimidos o intervenidos de cirugía cardíaca, en su mayoría con afectación de válvulas protésicas. Los principales agentes etiológicos de la EI fúngica son *Candida* spp., principalmente *Candida albicans*, y *Aspergillus* spp., que representan el 50% y el 25% de los casos de EI fúngica respectivamente. El 25% restante de EI

fúngicas lo conforma una amplia variedad de hongos infrecuentes entre los que se encuentran *Histoplasma spp.*, en zonas endémicas, o *Fusarium spp.*<sup>37</sup>.

Destaca esta entidad por su elevada tasa de mortalidad, del 30% al 50%, que es atribuible a la situación inmunológica del paciente, al diagnóstico tardío por presentar habitualmente hemocultivos negativos y al fracaso frecuente de la terapia antifúngica en ausencia de cirugía. Además, también se describe una alta tasa de recurrencia, por lo que en la actualidad la EI fúngica sigue constituyendo un reto terapéutico<sup>37,38</sup>.

### Otros

Entre otros microorganismos, también se han descrito como agentes causales de EI *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella spp.* y *Mycoplasma spp.*, así como bacterias causantes de zoonosis como *Brucella melitensis* o *Brucella spp.*, asociada al ganado bovino, y *Chlamydia psittaci*, asociada a pájaros como loros y palomas<sup>1</sup>.

#### 1.3.5.6 EI no filiadas

En una proporción variable de los casos, del 10% al 20%, no se documenta la etiología de la EI. En el registro EURO-ENDO<sup>14</sup> se describe un porcentaje de EI no filiadas del 21%, mientras que en el estudio ID-IRI esta proporción es del 9%<sup>15</sup>, similar a la descrita en España tanto en la serie del grupo GAMES (9,1%)<sup>11</sup>, como en el estudio del Hospital Ramón y Cajal (9,1%)<sup>8</sup>.

La principal razón por la que no se consigue determinar el agente causal en los medios de cultivo es que los pacientes suelen llevar tratamiento antibiótico previo

al cultivo. También puede deberse a que el agente etiológico sea un microorganismo exigente, de lento crecimiento o que no sea capaz de crecer en los medios de cultivo microbiológicos habituales, como ocurre con *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. o *Tropheryma whipplei*<sup>14,22</sup>.

Cabe mencionar que, a pesar de que los cultivos sean negativos, se puede llegar a un diagnóstico etiológico a través de la serología o de la aplicación de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Este tema se desarrollará en el apartado correspondiente.

### 1.4 Diagnóstico

La EI suele ser un diagnóstico sindrómico que se determina sobre la base de la presencia de múltiples resultados en lugar de un único resultado de prueba definitivo.

El diagnóstico de la EI se fundamenta en la evaluación conjunta de las manifestaciones clínicas, las pruebas de imagen y el diagnóstico microbiológico.

Los criterios de Duke integran todas estas áreas y en la actualidad se consideran el patrón de referencia para el diagnóstico de la EI. Fueron descritos por Durack *et al.* en 1994<sup>39</sup> y modificados en 2000 por Li *et al*<sup>40</sup>. Para la definición de EI definitiva se contemplan criterios patológicos y criterios clínicos.

Los criterios patológicos son: (1) Microorganismos demostrados por cultivo o examen histológico de una vegetación, una vegetación que se ha embolizado, o una muestra de absceso intracardiaco; o (2) lesiones patológicas; vegetación o

absceso intracardiaco confirmado por examen histológico que muestra endocarditis activa.

Los criterios clínicos se clasifican en criterios mayores y criterios menores y se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6. Criterios clínicos de Duke modificados.

<p><b>Criterios Mayores</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hemocultivos positivos para EI</li> <li>✓ Microorganismos típicos de EI en al menos 2 hemocultivos separados:             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Streptococcus viridans</i>, <i>Streptococcus</i> grupo <i>gallolyticus</i> (<i>bovis</i>), grupo HACEK, <i>Staphylococcus aureus</i>; o</li> <li>○ <i>Enterococcus</i> spp, adquirido en la comunidad, en ausencia de un foco primario o;</li> </ul> </li> <li>✓ Microorganismos en hemocultivos persistentemente positivos definidos como:             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2 o más hemocultivos positivos separados más de 12 horas; o</li> <li>○ 3 de 3 hemocultivos o la mayoría de 4 hemocultivos positivos separados (la primera y la última muestra separadas por 1 hora o más); o</li> </ul> </li> <li>✓ Un hemocultivo positivo para <i>Coxiella burnetii</i> o anticuerpos IgG fase I &gt; 1:800)</li> <li>2. Evidencia de compromiso endocárdico Ecocardiografía positiva para EI: vegetación (masa o estructura oscilante), absceso, dehiscencia parcial de una válvula protésica o nueva regurgitación valvular.</li> </ol>
<p><b>Criterios Menores</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lesión cardíaca predisponente o uso de drogas inyectables.</li> <li>2. Fiebre &gt; 38° C.</li> <li>3. Fenómenos vasculares: embolo en arterial mayor, infarto pulmonar séptico, aneurisma micótico, hemorragia intracraneal, hemorragia conjuntival y lesiones de Janeway.</li> <li>4. Fenómenos inmunológicos: glomerulonefritis, nódulos de Osler, manchas de Roth, y factor reumatoide.</li> <li>5. Evidencia microbiológica: hemocultivos positivos que no cumple criterios mayores o evidencia serológica de infección activa por un microorganismo que puede causar EI</li> <li>6. Hallazgos ecocardiográficos: compatible con EI, pero no encontrado como criterio mayor más arriba</li> </ol>

Según los Criterios de Duke modificados<sup>40</sup>, se considera diagnóstico de EI definitiva el cumplimiento de: (1) 2 criterios mayores; o (2) 1 criterio mayor y 3 criterios menores; o (3) 5 criterios menores. En el diagnóstico de EI posible se presenta: (1) 1 criterio mayor y 1 criterio menor; o (2) 3 criterios menores. Y, por último, la EI se rechaza en el caso de: (1) diagnóstico alternativo firme; o (2) resolución del

síndrome con terapia antibiótica durante 4 días o menos; o (3) ausencia de evidencia patológica de EI en cirugía o autopsia, con terapia antibiótica durante 4 días o menos; o (4) no se cumple con los criterios de EI posible.

Los criterios de Duke modificados presentan una sensibilidad del 70-79%<sup>41</sup>, por lo que una proporción de pacientes importante se categoriza como “EI posible”. Algunos autores como Cuervo *et al.*<sup>2</sup>, señalan que estos criterios están comprometidos en la era de la EI nosocomial ya que se ha descrito una disminución de la sensibilidad del diagnóstico según estos criterios en pacientes con prótesis vasculares<sup>42,43</sup>.

#### 1.4.1 Clínica

La clínica de la EI es diversa e inespecífica y presenta diferentes manifestaciones en función del primer órgano implicado, el microorganismo aislado, la enfermedad cardíaca de base y la aparición de complicaciones. Los síntomas y signos de la EI (Tabla 7) son variados y cualquier sistema orgánico puede estar afectado<sup>1</sup>.

Tabla 7. Manifestaciones clínicas de la EI. Tomada de Mandell *et al.*<sup>1</sup>.

<b>Signos</b>	<b>Pacientes (%)</b>
Fiebre	96
Soplo cardíaco	85
Soplo cambiante	20
Soplo nuevo	48
Episodio embólico	17
Nódulos de Osler	3
Hemorragia en astilla	8
Lesión de Janeway	5
Esplenomegalia	11
Manchas de Roth	2
Hematuria	26
Hemorragia conjuntival	5

En el cuadro clínico influyen: (1) el proceso infeccioso en la válvula, incluyendo las complicaciones intracardiacas locales; (2) la embolización séptica a prácticamente cualquier órgano; (3) la bacteriemia constante, a menudo con focos metastásicos de infección; y (4) los complejos inmunes circulantes y otros factores inmunopatológicos<sup>1</sup>.

Según el registro EURO-ENDO, la fiebre (77,7%) y la insuficiencia cardiaca congestiva (27,2%) fueron los síntomas más frecuentes, y los eventos embólicos sintomáticos estaban presentes al ingreso en el 25,3% de los pacientes<sup>14</sup>.

Cahill señala en su revisión de 2016<sup>17</sup> que, contrariamente a la enseñanza médica popular, los nódulos de Osler, las lesiones de Janeway y las manchas de Roth son raras. En cambio, complicaciones como insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular o émbolos infecciosos son mucho más comunes. En general, la sensibilidad y la especificidad de cualquier signo es baja y el diagnóstico de la EI no debe ser excluido basándose únicamente en el examen clínico<sup>17</sup>.

Por lo tanto, la presentación clínica de pacientes con EI es muy variable, y el diagnóstico diferencial a menudo es amplio. Debido a sus múltiples manifestaciones, el diagnóstico se puede retrasar y, en ocasiones, se identifica en el examen *post-mortem*. Algunos autores como Cuervo *et al.*<sup>2</sup> apuntan que la sospecha es especialmente complicada en los casos de endocarditis subaguda o crónica. En estos casos son comunes los síntomas inespecíficos, como anorexia, pérdida de peso, malestar general, fatiga, escalofríos, debilidad, náuseas, vómitos y

sudores. El diagnóstico puede confundirse con el de procesos neoplásicos, tuberculosis u otras enfermedades crónicas.

### 1.4.2 Pruebas de imagen

Respecto a las pruebas de imagen, la ecocardiografía transtorácica y transesofágica son las técnicas más ampliamente empleadas para el diagnóstico y seguimiento de la EI, pero pueden ser no concluyentes hasta en el 20% de los casos. Otras técnicas están adquiriendo relevancia, como la Tomografía Computarizada (TC o CT de sus siglas en inglés) o la Tomografía de Emisión de Positrones ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT,  $^{18}\text{F}$ -*fluorodeoxyglucose-positron emission tomography*/CT). Incluso se ha propuesto su uso como criterio diagnóstico adicional<sup>44</sup>.

#### 1.4.2.1 Ecocardiografía

La ecocardiografía es la técnica de imagen más ampliamente empleada y se debe realizar tan pronto como se sospeche la EI. Se consideran criterios mayores de Duke tres hallazgos ecocardiográficos: (1) presencia de vegetaciones, (2) presencia de abscesos o pseudoaneurisma y (3) dehiscencia de la válvula protésica<sup>45</sup>.

Existen dos modalidades de ecocardiografía: transtorácica (ETT) y transesofágica (ETE). Ambas presentan una especificidad similar, próxima al 90%, pero la sensibilidad de la ETE es superior, sobre todo en el caso de EI protésica y abscesos<sup>44</sup> (Tabla 8). También mejora la sensibilidad diagnóstica en el caso de EI asociada a dispositivos intravasculares<sup>46</sup>.

Tabla 8. Sensibilidad diagnóstica de la ecocardiografía transtorácica vs. transesofágica.

	ETT	ETE
Vegetación sobre válvula nativa	70%	96%
Endocarditis protésica	50%,	92%
Absceso	50%	90%

Abreviaturas: ETT= Ecocardiografía transtorácica; ETE= Ecocardiografía transesofágica.

Si la ecocardiografía inicial es negativa, se debe repetir en 5 o 7 días si se mantiene la sospecha diagnóstica, incluso antes si se sospecha una EI por *Staphylococcus aureus* debido a la agresividad que presenta este microorganismo<sup>47</sup>. Sin embargo, en un estudio retrospectivo reciente llevado a cabo por Marcos-Garces *et al.*<sup>48</sup>, se señala que, de 451 pacientes que presentaron una ETT inicial negativa sólo el 0,9% fue diagnosticado posteriormente de EI.

Por último, hay que apuntar que el seguimiento ecocardiográfico es necesario para la detección de posibles complicaciones y la monitorización del tratamiento.

#### 1.4.2.2 Tomografía Computarizada

Aunque la ETE se mantiene como el pilar fundamental del diagnóstico por imagen, existe un creciente interés por la TC cardiaca ya que proporciona más información sobre la anatomía de las afecciones perivalvulares como pseudoaneurismas, abscesos y fístulas<sup>2,44</sup>. Datos recientes defienden el uso complementario de esta técnica cuando se necesita una descripción anatómica más detallada en EI sobre válvula tanto protésica como nativa. Incluso un estudio reciente la dota de valor

pronóstico sugiriendo sinergismo con la ETE en la planificación de la cirugía y en la predicción de mortalidad a largo y corto plazo<sup>2</sup>.

Por otra parte, la TC representa una alternativa a la angiografía coronaria en la valoración preoperatoria de pacientes con elevado riesgo de embolismo, como es el caso de pacientes con vegetaciones aórticas o en situación de cirugía urgente<sup>44</sup>.

### 1.4.2.3 Medicina nuclear

Las técnicas de medicina nuclear permiten visualizar la respuesta inmune frente a un agente patógeno. Destacan dos técnicas<sup>44</sup>;

- Tomografía de Emisión de Positrones (Positron Emission Tomography o PET), que utiliza como marcador radiactivo el <sup>18</sup>F- fluorodesoxiglucosa (FDG). Este radiofármaco se incorpora activamente in vivo a los leucocitos, macrófagos, monocitos y linfocitos T CD4 que se acumulan en los lugares de infección y emite radiación gamma que es detectada por el equipo.
- Tomografía computarizada por emisión de fotón único (Single Photon Emission CT o SPECT). En este caso las imágenes obtenidas se basan en el uso de leucocitos autólogos radiomarcados (<sup>111</sup>In-oxina o <sup>99m</sup>Tc-hexametilpropilamina oxima) que se van acumulando en el lugar de la infección conforme avanza el tiempo. Se comparan imágenes secuenciales, lo que hace que sea una técnica más específica que la PET / TC con <sup>18</sup>F-FDG para la detección de EI y focos infecciosos. Es preferible en aquellas situaciones que requieran una mayor especificidad. Por el contrario, presenta algunas desventajas como (1) la necesidad de manipular sangre para la preparación de

radiofármacos, (2) la duración del procedimiento, más prolongado que en el caso de la PET / CT, y (3) que presenta una resolución espacial y una eficiencia de detección de fotones ligeramente inferiores a la PET / CT.

En caso de sospecha de EI protésica, estas técnicas han demostrado que incrementan la sensibilidad de los criterios de Duke hasta aproximadamente el 90% cuando se consideran como criterio mayor, por lo que la guía de la Sociedad Europea de Cardiología de 2015 ya las incorpora en su algoritmo diagnóstico en el caso de EI sobre válvula protésica o sobre dispositivo cardiaco<sup>44</sup>.

### 1.4.2.4 Resonancia magnética cerebral

La resonancia magnética cerebral también constituye una técnica complementaria. En pacientes con sospecha de EI sin alteraciones neurológicas puede tener impacto diagnóstico, ya que el hallazgo de alteraciones constituye un criterio menor de Duke y pueden propiciar un diagnóstico definitivo de EI. Por otro lado, en el caso de EI que ya presentan síntomas neurológicos permite mejorar la estrategia terapéutica, sobre todo en el momento de la cirugía<sup>44</sup>.

En resumen:

La Ecocardiografía es la técnica más ampliamente utilizada y está incluida en los criterios de Duke modificados<sup>40</sup>.

La TC cardiaca o corporal, la resonancia magnética cerebral, el <sup>18</sup>F-FDG PET/CT y el SPECT/CT con leucocitos autólogos marcados se consideran técnicas complementarias, ya que pueden mejorar la detección de fenómenos vasculares silentes, como eventos

embólicos o aneurismas infecciosos, y de otras lesiones del endocardio, mejorando la sensibilidad de los criterios de Duke modificados<sup>44</sup>.

En la guía ESC de 2015, se propone 3 criterios diagnósticos adicionales que se deben aplicar cuando existe una elevada sospecha de EI, pero los criterios de Duke modificados resultan en una EI posible o incluso la descartan. La Figura 7 presenta el algoritmo diagnóstico propuesto en esta guía, que incluye los criterios de diagnóstico modificados.

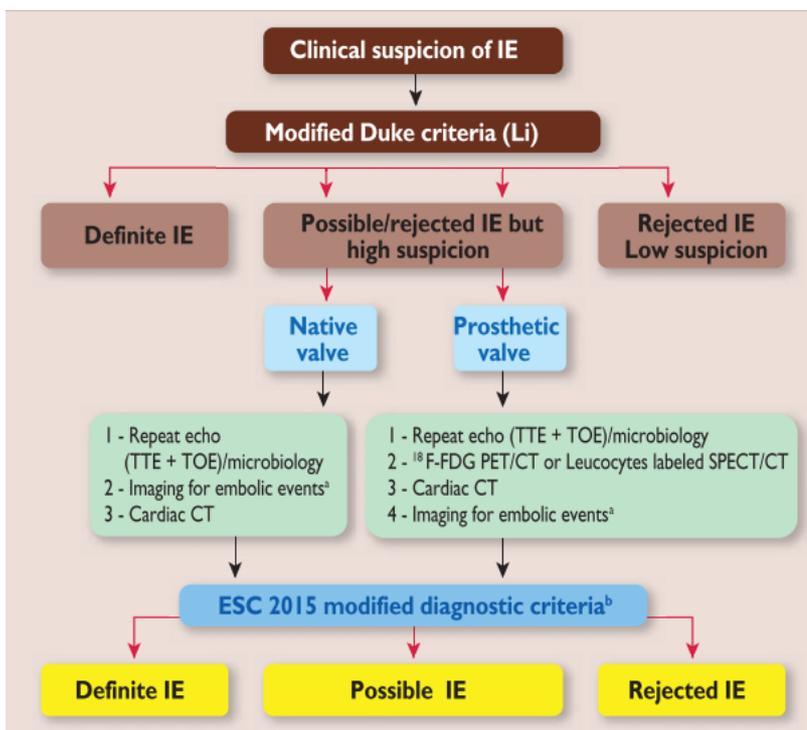


Figura 7. Algoritmo de diagnóstico de imagen de la EI según la Guía ESC 2015. Tomada de Habib *et al*<sup>44</sup>.

Abreviaturas: CT = computed tomography; FDG = fluorodeoxyglucose; IE = infective endocarditis; PET = positron emission tomography; SPECT = single photon emission computerized tomography; TOE = transthoracic echocardiography; TTE = transthoracic echocardiography.

### 1.4.3 Estudio anatomopatológico

El estudio histológico es considerado el patrón de referencia para el diagnóstico de la EI. La presencia de lesiones patológicas características de endocarditis activa en el examen histológico del tejido valvular resecado constituye un criterio patológico de Duke que define el diagnóstico de EI definitiva<sup>40</sup>. Siempre deben procesarse secciones representativas del material valvular para histopatología, independientemente de que se conozca o no el agente causal de la EI<sup>49</sup>. En el examen histológico del tejido valvular extirpado, los patrones y grados de inflamación variarán según el organismo infeccioso. La EI causada por organismos muy virulentos, como *Staphylococcus aureus*, a menudo se asocia con una inflamación aguda caracterizada por una extensa infiltración de neutrófilos, así como por grandes colonias de microorganismos con áreas asociadas de destrucción tisular. En casos de EI subaguda causada por organismos menos virulentos, como los *Streptococci* del grupo *viridans*, además de colonias focales e inflamación neutrofílica, puede haber evidencia de cicatrización, que incluye depósito de fibrina y células inflamatorias mononucleares. En casos de endocarditis por *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii* o *Tropheryma whipplei*, las válvulas muestran principalmente una inflamación crónica y pueden tener un aspecto macroscópicamente normal. Predomina la infiltración mononuclear, en lugar de neutrofílica, y los macrófagos son los más frecuentes<sup>49,50</sup>.

Es importante destacar que el análisis histopatológico puede facilitar el diagnóstico de causas no infecciosas de endocarditis, como las neoplásicas o autoinmunes, que representan hasta el 3% de los casos de endocarditis con cultivo negativo<sup>51</sup>.

### 1.5 Diagnóstico microbiológico clásico

El diagnóstico microbiológico permite la identificación del agente causal y la realización del antibiograma, fundamentales para la instauración del tratamiento antimicrobiano dirigido.

El diagnóstico microbiológico clásico de la EI incluye el hemocultivo, el cultivo del tejido o la prótesis valvular en caso de cirugía y la serología.

#### 1.5.1 Hemocultivo

La base del diagnóstico microbiológico convencional de la EI es el hemocultivo. El aislamiento de un microorganismo “típico de endocarditis” en dos hemocultivos o el aislamiento de cualquier otro microorganismo en más de dos hemocultivos, se considera un criterio mayor de Duke. Los microorganismos considerados “típicos de endocarditis” en los criterios de Duke son *Streptococci* del grupo *viridans*, *Streptococci* del grupo *gallolyticus (bovis)*, microorganismos del grupo HACEK, *Staphylococcus aureus* sin otro foco primario y *Enterococcus spp.*). Un único hemocultivo positivo de *Coxiella burnetii* también se considera un criterio mayor de Duke<sup>40</sup>.

A pesar de constituir la base del diagnóstico microbiológico, una proporción importante de los hemocultivos pueden ser negativos. Algunos estudios señalan que el hemocultivo puede ser negativo hasta en un 31% de los casos<sup>52,53</sup>. En la cohorte de GAMES este porcentaje de hemocultivos negativos es del 14,7%<sup>11</sup>.

Entre las causas que impiden la recuperación del microorganismo en el hemocultivo destacan la instauración del tratamiento antibiótico antes de la extracción del hemocultivo y los requerimientos especiales de incubación y la dificultad del cultivo de algunos microorganismos como *Brucella* spp., estreptococos defectivos, bacterias del grupo HACEK, *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii* o *Tropheryma whipplei*.

Todo esto se traduce en un diagnóstico inadecuado en una proporción importante de pacientes. Un estudio de la cohorte GAMES de 2016, apunta incluso a un mayor riesgo de destrucción valvular y mayor tendencia a la mortalidad que en las endocarditis con cultivo positivo<sup>54</sup>.

Otros procedimientos microbiológicos clásicos que complementan el cultivo de sangre son la serología y el cultivo del tejido valvular en el caso de que se lleve a cabo la cirugía.

### 1.5.2 Cultivo de válvula

El cultivo del tejido valvular presenta una baja sensibilidad (6-13%) y una elevada proporción de contaminaciones<sup>21,55</sup>. Esto ha llevado a algunos autores a no recomendarlo, aduciendo que puede crear más confusión ante un diagnóstico dudoso.

### 1.5.3 Serología

La práctica sistemática de estudios serológicos frente a microorganismos de difícil crecimiento en cultivo ha demostrado su utilidad para estratificar a los pacientes con sospecha de EI y determinar el agente etiológico<sup>53,56</sup>. Sin embargo, hay que tener en cuenta la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de las distintas técnicas serológicas.

Entendiendo que el éxito en el tratamiento se basa en la identificación del agente causal y el rápido inicio de una terapia antimicrobiana adecuada, a menudo combinada con cirugía, se hace patente la necesidad de mejorar las técnicas de diagnóstico microbiológicas.

### 1.6 Diagnóstico microbiológico molecular

En respuesta a esta problemática, en la última década del siglo XX se comenzaron a emplear las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de la EI<sup>57</sup>.

Los métodos moleculares se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que constituye la técnica más importante y revolucionaria de la biología molecular.

#### *Reacción en cadena de la polimerasa*

La PCR permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula. La técnica fue descrita en 1985 por Kary Mullis et al.<sup>58</sup>, que recibió por ello el Nobel de química en 1993. Mediante esta técnica se

simula en un tubo de reacción lo que sucede en el proceso de replicación celular.

Los componentes de la reacción de PCR son:

- ADN molde o material genético que contiene el gen o el fragmento que interesa amplificar.
- Cebadores o iniciadores (en inglés *primer*), que son fragmentos de ADN de 15-30 nucleótidos que se unen a la región diana que flanquea la región del ADN molde que se pretende amplificar. Estos cebadores aportan el extremo 3' libre para que se incorporen nuevos nucleótidos.
- Enzima Taq polimerasa, que es la enzima termoestable que cataliza la incorporación cebador-dependiente de nucleótidos en la dirección 5' → 3' en la nueva hebra de ADN.
- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), que conformarán la nueva cadena de ADN: desoxiadenina trifosfato (dATP), desoxiguanina trifosfato (dGTP), desoxicitosina trifosfato (dCTP) y desoxitimina trifosfato (dTTP).
- Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), ya que el Mg<sup>++</sup> es un cofactor necesario para la actividad de la enzima Taq polimerasa.

La PCR consta de tres etapas, determinadas por variaciones de la temperatura, que se repiten de manera cíclica. Las etapas de la PCR se esquematizan en la Figura 8 y son las siguientes:

1º. Desnaturalización: Separación de las hebras de ADN. Se aumenta la temperatura entre 94 y 96°C produciéndose la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los nucleótidos de las hebras complementarias. Al finalizar esta etapa se obtienen las cadenas sencillas del ADN inicial que se

## 1. Introducción

emplearán como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria.

- 2º. Anillamiento: Unión de los cebadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar. Para que este proceso suceda se debe disminuir la temperatura y situarla entre 40 y 60°C.
- 3º. Extensión del ADN mediante la acción de la Taq polimerasa. Para activar la Taq polimerasa se incrementa la temperatura a 72°C, que es la temperatura óptima a la cual la enzima se une a los cebadores y comienza la incorporación de nuevos nucleótidos a la cadena. Al finalizar esta etapa se habrá sintetizado una nueva cadena complementaria a la inicial.

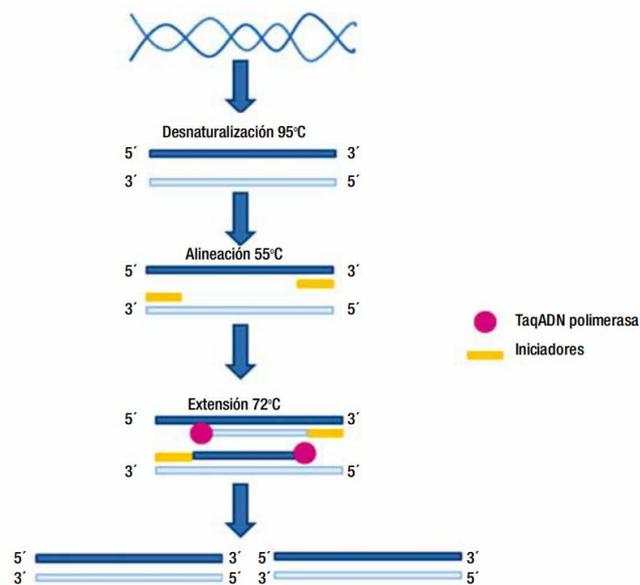


Figura 8. Etapas de la reacción de la PCR. Tomada de Ramírez-Pacheco *et al.*<sup>59</sup>

Estas tres etapas se repiten hasta un total de 30 a 45 ciclos, dependiendo del protocolo. En cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés

de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial ya que cada nueva copia sirve de molde en los ciclos siguientes, por lo que se obtienen millones de copias del ADN molde.

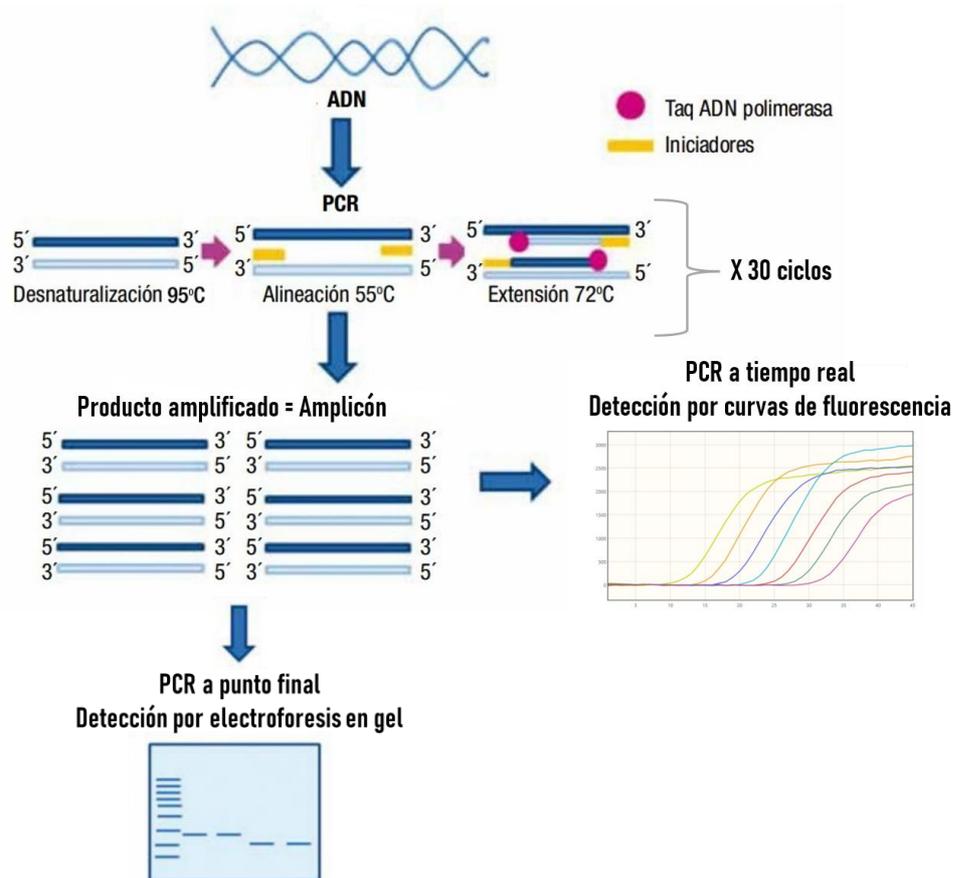


Figura 9. Ilustración del proceso de PCR y detección del *amplicón*. Adaptada de Ramírez-Pacheco *et al*<sup>59</sup>.

El producto amplificado se denomina amplicón y, en la PCR cualitativa o PCR a punto final, generalmente se detecta mediante electroforesis en gel de agarosa. En el caso de la PCR cuantitativa o PCR a tiempo real, el producto de amplificación es monitorizado conforme transcurre la reacción; la amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción midiendo el incremento de la fluorescencia, que será

proporcional al aumento de la concentración de ADN. Se generan curvas de amplificación en las que en el eje «Y» se indica la cantidad de fluorescencia y en el eje «X» los ciclos de la reacción. El ciclo a partir del cual es posible detectar fluorescencia se denomina ciclo umbral o CT (de las siglas en inglés *cycle threshold*).

La Figura 9 ilustra este proceso.

### 1.6.1 PCR universal seguida de secuenciación

En la PCR universal o de amplio espectro seguida de secuenciación se amplifican y posteriormente se secuencian genes presentes en todos los microorganismos. Estos genes codifican el ARN presente en los ribosomas, denominado ARN ribosomal (ARNr)<sup>60</sup>.

#### 1.6.1.1 ARN ribosomal

El ARN ribosomal es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía<sup>61</sup>. Es una molécula muy antigua y muy conservada, presente en los ribosomas de los organismos procariotas y eucariotas. El ribosoma procariota presenta un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y se disocia en una subunidad grande (50S) y una subunidad pequeña (30S). La subunidad mayor está formada por 31 proteínas y dos moléculas de ARN ribosomal, 23S y 5S, mientras que la subunidad menor está formada por 21 proteínas y una molécula de ARN ribosomal, 16S. En las células eucariotas, el ribosoma tiene un coeficiente de sedimentación de 80S y también se disocia en dos subunidades. La subunidad mayor (60S) está formada por 50 proteínas y tres

moléculas de ARN ribosomal, 28S, 5,8S y 5S, y la subunidad menor (40S) está formada por 33 proteínas y una molécula de ARN ribosomal, 18S.

En 1990 Carl Woese propuso la clasificación de los seres vivos en base a la secuenciación y análisis del ARN ribosomal de la subunidad pequeña del ribosoma; ARNr 16S en procariontes y ARNr 18S en eucariotas. Según esta clasificación los seres vivos se dividen en tres dominios: *Bacteria*, *Archea* y *Eukarya*<sup>62</sup>.

Desde entonces, el análisis del ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota y para la clasificación e identificación bacteriana<sup>61</sup>.

El ARN ribosomal se puede caracterizar en términos de secuencia parcial, mediante el método de catalogación de oligonucleótidos, utilizado en los estudios pioneros de Woese, o mediante secuenciación del gen que lo codifica, como se describe a continuación.

### 1.6.1.2 PCR universal

La secuencia de nucleótidos de los genes que codifican las moléculas de ARN ribosomal presenta regiones conservadas comunes a todas las bacterias (u hongos), que están flanqueadas por regiones variables o muy variables, características de cada especie. Las regiones conservadas son responsables de la "universalidad" del gen diana, ya que los cebadores empleados en la PCR universal se diseñan para que hibriden con estas regiones, por lo que para todos los microorganismos se utilizarán los mismos cebadores y, en el proceso de la PCR, se amplifican las regiones variables. Posteriormente, mediante la técnica de

secuenciación, se determina la secuencia de nucleótidos de esta región variable y se compara con secuencias de referencia depositadas en bibliotecas de secuencias públicas o privadas. De esta forma se permite la identificación del microorganismo en cuestión<sup>63,64</sup>.

En resumen, la principal ventaja de la PCR universal o de amplio espectro es que permite amplificar secuencias de nucleótidos características de cada microorganismo empleando los mismos cebadores para todas las bacterias (PCR universal 16S) o para todos los hongos (PCR universal 18S).

#### a) Genes empleados en la identificación de bacterias

En el caso de las bacterias, que son organismos procariotas, principalmente se amplifica y secuencia el gen *rrs*, que codifica ARN ribosomal de la subunidad pequeña del ribosoma 16S. La variabilidad genética entre secuencias del ARN ribosomal 16S no se encuentra distribuida de forma homogénea en toda la extensión del gen, sino que se concentra en nueve regiones hipervariables (V1-V9)<sup>65</sup>, como se muestra en la Figura 10. Además, algunas de estas regiones presentan mayor variabilidad que otras y permiten obtener una asignación taxonómica más precisa<sup>66</sup>.

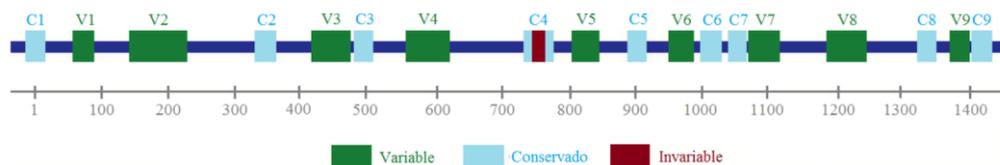


Figura 10. Esquema del gen que codifica el ARN ribosomal 16S. Tomada de Izquierdo<sup>67</sup>.

Otras secuencias diana que se han utilizado para la identificación de bacterias, son el gen que codifica el ARN ribosomal 23S y la secuencia de la región espaciadora entre los genes del ARN ribosomal 16S y 23S<sup>63</sup>.

### b) Genes empleados en la identificación de hongos

Para la identificación de los hongos filamentosos y las levaduras, que son organismos eucariotas, el gen diana más empleado es el que codifica el ARN ribosomal 18S, aunque también se pueden utilizar otras secuencias diana como el gen que codifica ARN ribosomal 28S y la secuencia de la región espaciadora situada entre los genes que codifican el ARN ribosomal 18S, 28S y 5,8S<sup>63,64</sup>.

#### 1.6.1.3 Secuenciación Sanger

La secuenciación del ADN es una herramienta cada vez más importante para el genotipado en el diagnóstico molecular. Consiste en determinar la secuencia de nucleótidos que presenta un material genético determinado.

Esta técnica ha evolucionado desde la década de 1970, siendo la secuenciación de Sanger o método de terminación de la cadena, diseñada por Sanger en 1977<sup>68</sup>, la más ampliamente utilizada. Consiste en una PCR que, entre sus reactivos, además de emplear los dNTPs habituales (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), incluye una pequeña concentración de didesoxinucleótidos trifosfato (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP), cada uno con un marcaje de fluorescencia diferente. Estos 4 didesoxinucleótidos (ddNTPs) son análogos a los dNTPs, pero presentan un hidrógeno en lugar de un grupo hidroxilo en el carbono 3' del azúcar desoxirribosa. Esta estructura química permite a la Taq polimerasa integrar a los ddNTP en la cadena sintetizada, pero

impide la extensión de la hebra, ya que carece del grupo hidroxilo en el carbono 3' necesario para la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido entrante. Por lo tanto, cuando un ddNTP es añadido a la cadena de ADN se produce la terminación de la extensión de dicha hebra. El producto final de la PCR de secuenciación es una colección de fragmentos de diferentes longitudes con la misma secuencia inicial pero que terminan en diferentes nucleótidos. Cada fragmento estará marcado con el fluoróforo del ddNTP que haya provocado la terminación de la cadena<sup>69</sup>. En la Figura 11 se ilustra el proceso de secuenciación Sanger utilizando como ejemplo la terminación de la hebra por adición de ddATP.

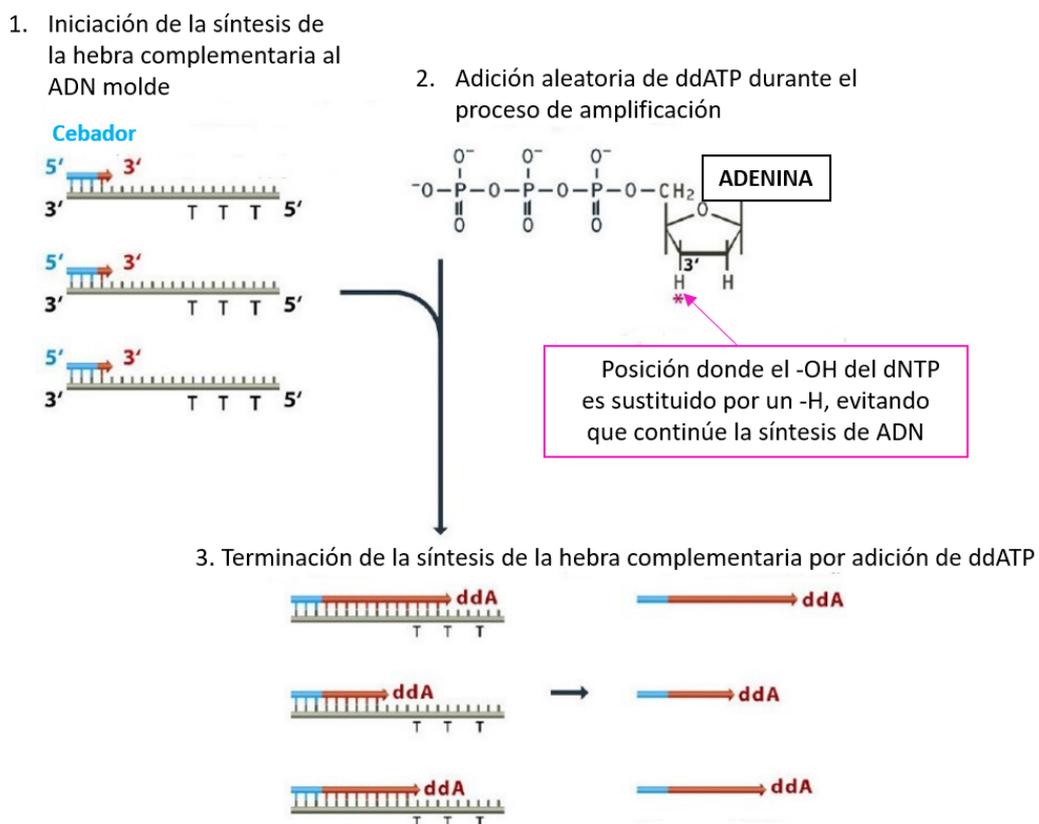


Figura 11. Ilustración del proceso de secuenciación Sanger o método por terminación de la cadena, en este ejemplo por adición de ddATP. Adaptada de Church *et al*<sup>69</sup>.

En el secuenciador automatizado se produce la separación por electroforesis capilar en gel de poliacrilamida de los distintos fragmentos de ADN marcados con fluorescencia dependiendo de su tamaño. Después de la separación, un lector detecta la fluorescencia y se genera un electroferograma en el que se representa cada base con su fluoróforo correspondiente. El orden de detección de los ddNTPs determina la secuencia de ADN molde<sup>60,69</sup>.

### 1.6.1.4 Aplicación de la técnica en muestras clínicas

Esta tecnología se ha estudiado ampliamente para detectar microorganismos directamente en el tejido infectado y se ha descrito un impacto directo en el tratamiento y en el manejo de los pacientes. Kerkhoff *et al.*<sup>70</sup> estudiaron el impacto en el diagnóstico de la realización de la PCR universal en diferentes tipos de muestra. Entre los tipos de muestras analizadas, aquellas que tenían más probabilidades de tener un resultado clínicamente significativo asociado a un cambio en el tratamiento fueron: tejido blando (proporción clínicamente significativa = 23,4 %; proporción que cambió el tratamiento antibiótico = 6,4 %), biopsia paraespinal (22,7 % y 13,6 %, respectivamente), biopsia pulmonar (17,5% y 7,9%, respectivamente), biopsia cerebro (12,5 % y 8,9 %, respectivamente) y tejido de ganglio linfático (10,3 % y 7,4%, respectivamente). En el caso del líquido cefalorraquídeo solo el 3,4 % (9/263) de las muestras tuvo un resultado positivo clínicamente significativo y el manejo clínico se cambió en solo el 1,5 % (n = 4/263) de casos. Concluyeron que el rendimiento de la PCR se maximiza en determinadas situaciones regidas por a) el tipo de muestra: la sensibilidad de la

técnica en tejido es significativamente superior a la obtenida en muestras líquidas o fluidas (14,1% vs. 5,5%;  $p < 0,001$ ) y b) la presencia de inflamación u organismos visualizados en la histopatología correspondiente. Respecto al impacto diagnóstico global, la PCR universal fue positiva en un 10% de las muestras y tuvo un impacto en el tratamiento en el 4% de los casos.

### PCR universal en muestras de tejido valvular

Goldenberger *et al.*<sup>71</sup> fueron los primeros en estudiar el uso de la PCR de amplio espectro en tejido valvular en 1997. Se postuló entonces como una herramienta prometedora y ya en 2001 se propuso como un nuevo criterio de Duke<sup>72</sup>, lo que ha sido respaldado por diferentes autores<sup>73-76</sup> entre los que se incluye el grupo español de Marín *et al.*<sup>55</sup>.

Esta técnica ha permitido la identificación del agente causal hasta en el 60% de los casos con hemocultivo negativo<sup>21</sup> y presenta una elevada correlación con los estudios histopatológicos<sup>21,75,77</sup> y serológicos<sup>78</sup>.

En 2016, Miller *et al.*<sup>79</sup> publicaron una revisión que engloba 18 estudios en los que se utiliza la PCR universal directamente sobre muestras valvulares. Se destaca la variabilidad de resultados en las diferentes series, con rangos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 41,2-100%, 61,5-100%, 79-100% y 34,4-100%, respectivamente. Esta variación se puede explicar por las diferencias en el patrón de referencia empleado para el diagnóstico de la EI en cada estudio y porque se trata de técnicas no estandarizadas. En cualquier caso, en todos los estudios se

confirma la mayor sensibilidad de la PCR de amplio espectro en válvula frente al cultivo bacteriológico<sup>79</sup>.

Por lo tanto, estas técnicas aplicadas directamente al tejido valvular representan una importante alternativa para determinar el agente etiológico de la EI.

### PCR universal en sangre

La misma tecnología se puede aplicar en sangre, y en el caso de la EI, beneficiaría también a pacientes no sometidos a cirugía. Sin embargo, hasta la fecha los estudios realizados en pacientes con hemocultivo negativo muestran una baja sensibilidad y elevada proporción de contaminaciones<sup>51,80-83</sup>. En el estudio de Forunier *et al.*<sup>84</sup> la PCR universal en sangre se reveló como la técnica microbiológica que presentó una menor sensibilidad.

#### 1.6.2 PCR específica

En la PCR específica se utilizan los cebadores específicos para un microorganismo concreto, por lo tanto, para la detección de cada microorganismo se requerirán unos reactivos concretos.

Esta técnica también se puede llevar a cabo en cualquier tipo de muestra, incluyendo sangre y tejido valvular y presenta una mayor sensibilidad que la PCR de amplio espectro<sup>84</sup>. En el caso del diagnóstico de EI, la PCR específica en sangre para ciertos microorganismos como *Bartonella* spp. *Coxiella burnetii* y *Tropheryma whippelii* han demostrado su utilidad<sup>84,85</sup>. De hecho, ante resultados negativos de hemocultivo, la guía europea propone la realización de técnicas de PCR en sangre

frente a patógenos específicos atendiendo a la serología<sup>44</sup>. Sin embargo, la sensibilidad de la PCR específica en sangre continúa siendo menor que la de la PCR universal sobre tejido valvular, incluso menor que la serología, como describe el trabajo de Fournier *et al*<sup>84</sup>.

### 1.6.3 Limitaciones de las técnicas de diagnóstico molecular

Uno de los inconvenientes de las técnicas moleculares, es que la detección de ácidos nucleicos no implica que el microorganismo sea viable. Estudios previos han demostrado que material genético de bacterias y hongos puede estar presente en tejido años después de un episodio de EI<sup>86</sup>, por lo que los resultados siempre se deben interpretar de acuerdo con la clínica. Otra limitación es la posibilidad de falsos positivos por contaminación o falsos negativos por la presencia de inhibidores de la PCR, siendo necesario el empleo de controles negativos y controles internos adecuados que permitan detectarlos<sup>77</sup>.

Para evitar la contaminación del entorno del laboratorio con el ADN inicial y el ADN amplificado se debe implementar un flujo de trabajo unidireccional para minimizar la potencial contaminación por los *amplicones* de los espacios de trabajo, las muestras y los reactivos primarios<sup>60</sup>.

En particular, destacan las limitaciones existentes para la diferenciación de los microorganismos a nivel de especie por la similitud de las secuencias del gen 16S ARNr en algunos casos, y el número limitado de secuencias de referencia disponibles actualmente en las bases de datos públicas.

### 1.7 Tratamiento y prevención

El tratamiento exitoso de la EI se basa en la erradicación del microorganismo con antibioterapia. El tratamiento empírico y dirigido atendiendo al agente etiológico fue revisado en 2015 en la Guía Europea<sup>44</sup>. El tratamiento quirúrgico contribuye con la eliminación del tejido infectado y es requerido en aproximadamente la mitad de los casos<sup>17,44</sup>.

#### 1.7.1 Importancia de las unidades de endocarditis

La complejidad del abordaje de la EI se traduce en la necesidad del trabajo conjunto de expertos en múltiples campos para su manejo. La guía de la Sociedad Europea de Cardiología de 2015, recomienda la formación Unidades Multidisciplinarias Especializadas en EI en hospitales terciarios. Se aboga por un enfoque conjunto de diversos especialistas (cardiólogos, cirujanos cardiacos, internistas, infectólogos, radiólogos, microbiólogos y farmacéuticos) para conseguir un correcto diagnóstico, tratamiento y monitorización del paciente<sup>44</sup>. El manejo de la EI coordinado en estas unidades ha demostrado que disminuye la mortalidad de la EI en un año en diferentes centros<sup>87</sup>.

#### 1.7.2 Tratamiento antibiótico

La selección del antibiótico para cada caso particular de EI y para cada tipo de microorganismo es complicado y está recogido en las guías clínicas<sup>44,88</sup>. A pesar de las directrices, existe una elevada heterogeneidad en el manejo de la EI y algunos

autores como Cuervo *et al.*<sup>2</sup> denuncian una falta de adherencia a las guías incluso por parte de aquellos que las desarrollaron.

Para un correcto tratamiento es necesario conocer la fisiopatología de la EI. Teniendo en cuenta que en las vegetaciones existe una alta carga de población microbiana protegida por el *biofilm*, para erradicar los microorganismos se requerirá el uso de antibióticos bactericidas o fungicidas en altas dosis durante largo tiempo<sup>89</sup>.

Según las guías, la terapia estándar de tratamiento intravenoso tiene una duración de 4 a 6 semanas en función del tipo de EI, sobre válvula nativa o protésica, y del agente etiológico<sup>44,88</sup>. El cálculo del tiempo necesario se contabiliza desde que se negativizan los hemocultivos o desde el momento de la cirugía si el cultivo de la válvula ha sido positivo<sup>87,88</sup>.

### 1.7.2.1 Tratamiento intravenoso vs. oral

El tratamiento intravenoso conlleva un mayor riesgo de fenómenos trombóticos, además de un incremento de la estancia hospitalaria y de los costes<sup>90</sup>. En la última década del siglo pasado se llevaron a cabo estudios comparativos de terapia oral vs. intravenosa en pacientes UDVP con EI por *Staphylococcus aureus*, que mostraron resultados favorables para la terapia oral<sup>91</sup>. En un estudio de 2019 realizado por Iversen *et al.*, no se hallaron diferencias significativas entre la terapia intravenosa y la terapia oral en una serie de 400 pacientes<sup>92</sup>. Sin embargo, El-Dalati *et al.*<sup>90</sup> señalan que en este estudio el porcentaje de *Staphylococcus aureus* resistente

a metilicina no es elevado y se excluyen pacientes con absceso cardiaco, leucocitosis persistente e infecciones de otras localizaciones.

En resumen, la terapia oral podría representar una opción válida, pero son necesarios más estudios para confirmar estos indicios.

### 1.7.2.2 Duración del tratamiento antibiótico

Respecto a la duración del tratamiento, está aumentando la evidencia que aboga por el acortamiento del tiempo de tratamiento tras cirugía<sup>90</sup>. En un estudio reciente no se detectaron diferencias en la mortalidad ni en la tasa de recaída en pacientes tratados durante más o menos de dos semanas tras la cirugía<sup>93</sup>.

En el caso de pacientes que requieren largos ciclos de antibióticos pero que no pueden completar la pauta oral o intravenosa, los lipopéptidos inyectables de larga duración pueden ser una alternativa aunque serían necesarios más estudios en pacientes con EI<sup>90,94</sup>.

### 1.7.3 Tratamiento quirúrgico

El objetivo de la cirugía es reseca todo el tejido infectado y restaurar la función normal de la válvula<sup>87</sup>. Más de la mitad de los casos de EI requieren cirugía y una parte importante de estos deben ser intervenidos durante la fase activa de la infección, es decir, cuando el paciente aún está hospitalizado y no se ha completado la pauta antibiótica, lo que se denomina cirugía temprana<sup>2</sup>. Las guías clínicas americana y europea presentan indicaciones similares para la cirugía temprana<sup>44,88</sup>.

A pesar del énfasis de las guías en la intervención quirúrgica temprana en determinados pacientes con EI, hay autores como Chirillo<sup>87</sup> que defienden que no hay evidencia científica favorable suficiente y que lo razonable es que esta decisión se base en el estudio personalizado de cada caso. Esto se traduce en que una proporción significativa de pacientes en los que las guías recomiendan cirugía no sean intervenidos. La concordancia entre la indicación teórica de cirugía y la práctica actual ha sido analizada tanto en el estudio ICE<sup>22</sup> como en el EURO-ENDO<sup>14</sup>. En el primer registro, el 74% de los pacientes tenían indicación teórica para la cirugía durante la fase activa de la EI y sólo el 57% fueron intervenidos. En el registro EURO-ENDO, no fueron sometidos a cirugía el 58,2% de los pacientes con indicación quirúrgica teórica. Como se ha comentado, la ausencia de cirugía a pesar de su recomendación teórica se asocia con una mayor mortalidad<sup>11,14</sup>.

### 1.7.4 Prevención

La utilización de antibióticos para prevenir la EI ha estado presente durante más de seis décadas, y se remonta a las directrices de la AHA (*American Heart Association*) publicadas en la década de los 60 del siglo XX, que recomendaban el uso de penicilina intramuscular para personas con cardiopatía reumática y cardiopatía coronaria antes de los procedimientos dentales invasivos<sup>10,95</sup>. Desde entonces, se han publicado múltiples actualizaciones y revisiones de estas pautas y se han valorado los pros y contras a la profilaxis antibiótica<sup>10</sup>. Sobre la base de estas consideraciones, las guías actuales, tanto la europea<sup>44</sup> como la americana<sup>88</sup>, recomiendan que sólo los pacientes de alto riesgo, pacientes con válvula cardíaca

protésica, con antecedentes de EI previa o cardiopatía congénita compleja, reciban profilaxis con antibióticos antes de un procedimiento dental invasivo. Por otro lado, las directrices del NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*) del Reino Unido están en contra de la profilaxis con antibióticos en todos los casos<sup>96</sup>. Sin embargo, sí que existe un acuerdo general en que los pacientes con afecciones cardíacas predisponentes deben cumplir algunas reglas de comportamiento como: hacer revisiones bucales regulares, realizar una desinfección minuciosa de heridas, tomar antibioterapia curativa para cualquier foco de infección bacteriana y evitar tatuajes y *piercings*<sup>87</sup>.

Recientemente se han publicado estudios sobre las variaciones de la incidencia de EI tras las restricciones de la profilaxis antibiótica con resultados controvertidos, por lo que las consecuencias de esta premisa en la incidencia actual de la EI siguen sin estar claras<sup>10,87</sup>. Según el estudio EURO-ENDO de 2019<sup>14</sup>, no ha aumentado la endocarditis estreptocócica oral desde la implementación de las recomendaciones que restringen las indicaciones para la profilaxis antibiótica, de hecho, se detecta una disminución de la EI debida a este microorganismo. Quan *et al.* describieron también tendencias crecientes de EI en Inglaterra tras la puesta en marcha de las recomendaciones de la guía NICE en 2008<sup>97</sup>. Sin embargo, defienden que no se correlacionaron con las modificaciones en la profilaxis, ya que no se aprecia un aumento en la prevalencia de *Streptococci* del grupo *viridans* como patógeno causante.

### 1.8 Perspectivas de futuro

#### 1.8.1 Perspectivas en el diagnóstico microbiológico

Las perspectivas futuras del diagnóstico microbiológico molecular están enfocadas a las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación o NGS (de sus siglas en inglés *Next Generation Sequencing*). Esta tecnología permite secuenciar cientos de millones de fragmentos de ADN de forma masiva y en paralelo.

Para la identificación de microorganismos patógenos se utilizan dos grandes estrategias de secuenciación; una más dirigida, basada en la utilización de cebadores específicos para la secuenciación de determinados genes como el ARNr 16S para bacterias o la secuencias ITS1/ITS2 para hongos, y otra, basada en la secuenciación de genomas completos. Ambas estrategias permiten trabajar directamente con muestras clínicas, y presentan la ventaja de que consiguen caracterizar, desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, la diversidad de patógenos presentes en muestras polimicrobianas<sup>98</sup>. Se han publicado algunos estudios sobre la aplicación de esta tecnología en el diagnóstico de la EI<sup>99,100</sup>, y aunque se indica que en la actualidad su realización en el diagnóstico de rutina sería costosa, presenta un interés clínico creciente porque permite una identificación de patógenos más rápida que el cultivo habitual. Además tiene el potencial de detectar múltiples organismos (incluyendo patógenos poco comunes), realizar la tipificación bacteriana y predecir el perfil de resistencia a los antibióticos, y todo en la misma prueba<sup>99</sup>.

### 1.8.2 Perspectivas en el diagnóstico clínico y tratamiento

Respecto al manejo de la enfermedad, se requieren datos sólidos para abordar una serie de preguntas urgentes en la EI, que incluyen cómo prevenir la EI, cuál es el momento óptimo de la cirugía cardíaca y cómo reducir las complicaciones relacionadas con la EI<sup>10</sup>. Asimismo, es necesario obtener más información sobre la adherencia a las guías clínicas, tanto en el ámbito diagnóstico como en el terapéutico, hecho que puede influir notablemente en los resultados clínicos.

El número de ensayos clínicos aleatorizados que estudian la EI es limitado, ya que es una enfermedad poco frecuente, y se necesita investigación basada en evidencia para abordar estas cuestiones. Más estudios sobre la EI y el registro sistemático de los datos y los estudios realizados, permitirían el uso de la “Inteligencia Artificial” para desarrollar algoritmos diagnósticos útiles en el manejo de los pacientes con EI. Esta herramienta se ha estudiado en varias áreas de la atención sanitaria y la práctica clínica, como la medicina de precisión o la salud poblacional<sup>101</sup>. En el caso de la EI, la creación de bases de datos completas y fiables permitiría, por ejemplo, emplear los datos incluidos en el registro de salud electrónico para identificar a los pacientes con mayor riesgo de EI o utilizar la caracterización de las vegetaciones para predecir la respuesta a la terapia antimicrobiana o el riesgo de complicaciones. También podría ayudar a identificar a los pacientes que se beneficiarían de recibir profilaxis antibiótica o a decidir la idoneidad de la intervención quirúrgica y el momento de la cirugía. En resumen, la “Inteligencia Artificial” permitiría individualizar decisiones médico-quirúrgicas complejas, que

podrían afectar sustancialmente a la evolución del paciente y a la duración de la estancia hospitalaria y del tratamiento antibiótico<sup>10</sup>.

## **2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

La EI es una enfermedad grave y, aunque es poco frecuente, su incidencia aumenta paulatinamente y sigue presentando una mortalidad elevada en la que influyen, entre otros factores, la dificultad diagnóstica y las limitaciones existentes en su tratamiento.

EL diagnóstico microbiológico es una pieza clave tanto a la hora de ayudar a establecer el tratamiento individualizado como al diseñar estrategias terapéuticas en los distintos grupos de pacientes con EI.

Las técnicas moleculares están aportando nuevas aproximaciones encaminadas a la identificación precisa de los agentes etiológicos implicados en el desarrollo de las endocarditis. Estas técnicas, aplicadas en muestras directas obtenidas de las zonas afectadas, ofrecen mejoras tanto en el diagnóstico como en la planificación del tratamiento y, junto con los hemocultivos, los estudios serológicos y los histopatológicos, constituyen un amplio espectro de posibilidades para el estudio de los agentes causales de la EI.

La estandarización de las técnicas y su implementación en la actividad diaria se encuentran en fase de desarrollo. Teniendo presente su complejidad y la variabilidad de los resultados reportados, y partiendo de la hipótesis de que su utilización rutinaria en los centros en los que se tratan los pacientes con sospecha de EI va a mejorar el diagnóstico de este tipo de procesos, se ha planteado el presente estudio con los siguientes objetivos:

### 2.1 Objetivo principal

- Comprobar la validez de la técnica de la PCR universal seguida de secuenciación directa de bacterias y hongos a partir de tejido valvular en el laboratorio de un hospital terciario de nuestra comunidad, comparando los resultados obtenidos en pacientes con EI sometidos a cirugía y en un grupo control.

### 2.2 Objetivos secundarios

- Investigar la contribución de las técnicas moleculares al diagnóstico etiológico en pacientes con EI comparando los resultados con aquellos obtenidos con las técnicas diagnósticas habituales, para determinar la potencia de las herramientas moleculares en el diagnóstico de los pacientes con EI.
- Analizar la relación entre el diagnóstico molecular y el diagnóstico clásico, que incluye el hemocultivo, el cultivo de tejido valvular de bacterias y hongos y la serología.
- Comparar los resultados obtenidos con el diagnóstico microbiológico y con el estudio histológico del tejido valvular.

### **3 MATERIAL Y METODOS**

### 3.1 Tipo de estudio

El presente trabajo consiste en un estudio observacional con registro prospectivo de todos los casos de pacientes con sospecha de EI o EI confirmada sometidos a cirugía en un periodo de 3 años (2017-2019).

### 3.2 Lugar de realización del estudio y características del centro

El Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia es un hospital terciario de titularidad y gestión pública dependiente de la Conselleria de Sanitat de la Comunitat Valenciana. Es el centro del Departamento de Salud Valencia La Fe y se responsabiliza de la atención sanitaria de 300.000 habitantes. A esta población se suman pacientes de otros departamentos que acuden al hospital por su carácter de referencia en diversas especialidades, entre las que se encuentra la cirugía cardíaca.

### 3.3 Población de estudio

El grupo de estudio está formado por pacientes mayores de 18 años diagnosticados de EI definitiva o posible, de acuerdo con los criterios de Duke modificados, e intervenidos quirúrgicamente para reseca la válvula infectada. Para el grupo control se seleccionaron pacientes mayores de 18 años sometidos a cirugía electiva por disfunción valvular en los que no existía sospecha de EI. Las características de ambos grupos se exponen más adelante, en el apartado de Resultados.

#### 3.4 Aspectos éticos

El presente trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (número de registro 2017/0271).

#### 3.5 Recogida de datos

La recogida de datos se realizó a través de los sistemas de información del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (GestLab y Orion Clinic). Las historias clínicas se revisaron tras la cirugía. Se recopilaron características clínicas y demográficas de todos los pacientes, que incluyeron: edad, sexo y válvula afectada. También se recogieron datos de antecedentes de EI, válvula protésica, uso de drogas intravenosas y otros factores predisponentes, y de tratamiento antibiótico en el momento de la cirugía. Los datos recogidos se incluyeron y analizaron en una base de datos diseñada en el programa de *software* Microsoft Excel® (Office 2016, Microsoft Corporation).

#### 3.6 Diagnóstico microbiológico clásico

El diagnóstico microbiológico clásico se llevó a cabo de forma rutinaria en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe como se detalla a continuación:

##### 3.6.1 Hemocultivo

Se procesaron los hemocultivos de los pacientes del grupo de estudio. A estos pacientes con sospecha de EI se les realizó la extracción de sangre, inoculando un

### 3. Material y métodos

mínimo de 5 mL en cada frasco de hemocultivo, aerobio (BacT/Alert® FA) y anaerobio (BacT/Alert® FN). Los frascos se transportaron al laboratorio de Microbiología y se introdujeron en el sistema VIRTUO (BioMerieux®). Se incubaron en el equipo a 37°C durante un mínimo de 5 días realizándose una monitorización del crecimiento cada 4 horas. En los casos de detección de crecimiento en el hemocultivo, se procedió a realizar una tinción de Gram y un subcultivo en caldo de tioglicolato, agar sangre y agar chocolate, que se incubaron durante 24/48 horas a 37°C (en atmósfera de CO<sub>2</sub> en el caso del agar chocolate).

#### 3.6.2 Cultivo del tejido valvular

El cultivo de tejido valvular se realizó en los pacientes del grupo de estudio y del grupo de control. De cada muestra se realizó (1) la tinción de Gram del tejido, (2) el cultivo bacteriológico, en el que se inoculó la muestra en caldo de tioglicolato, agar sangre y agar chocolate, con una incubación mínima de 5 días a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> en el caso del agar chocolate, y (3) el cultivo micológico, en el que se inoculó la muestra en un medio líquido de *Sabouraud* y se incubó a 30°C durante 30 días.

#### 3.6.3 Identificación y antibiograma

La identificación de los microorganismos aislados se realizó por espectrometría de masas en el equipo Vitek MS system (BioMerieux®) y para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se utilizaron los paneles de MicroScan (Dade Behring®) y procedimientos microbiológicos convencionales.

## 3.6.4 Estudio serológico

En caso de sospecha clínica, se realizaron las correspondientes pruebas serológicas mediante las técnicas recogidas en la Tabla 9:

Tabla 9. Técnicas serológicas utilizadas.

<b>Detección de anticuerpos frente a:</b>	<b>Técnica analítica</b>
<i>Coxiella burnetii</i>	Inmunofluorescencia indirecta (QFever IFAIgG Focus Diagnostics®)
<i>Bartonella</i> spp.	Inmunofluorescencia indirecta (Bartonella IFAIgG / IFAIgM, Focus Diagnostic®)
<i>Brucella</i> spp.	Aglutinación (Brucellosilide-Test®; Antígeno Rosa Bengala)
<i>Legionella pneumophila</i>	ELISA (Trinity Biotech Captia™ Legionella pneumophila IgG/IgM)

## 3.7 Diagnóstico microbiológico por métodos moleculares

El procedimiento a seguir tras la recepción de muestras en la Sección de Biología Molecular del Servicio de Microbiología se describe resumidamente a continuación y está esquematizado en la Figura 12.

A partir del tejido valvular se procede al proceso de (1) digestión proteolítica de la muestra y posterior extracción del material genético, (2) PCR de amplio espectro 16S o 18S: si existen bacterias u hongos en el tejido se obtendrán millones de copias de sus genes. A partir del material genético amplificado, *amplicón*, se realiza la (3) PCR de secuenciación y posterior electroforesis capilar en el equipo secuenciador. Se obtiene un cromatograma de la secuencia de nucleótidos de la región del ADN amplificado y su (4) análisis permite la identificación del microorganismo por comparación de la secuencia con una base de datos conocida.

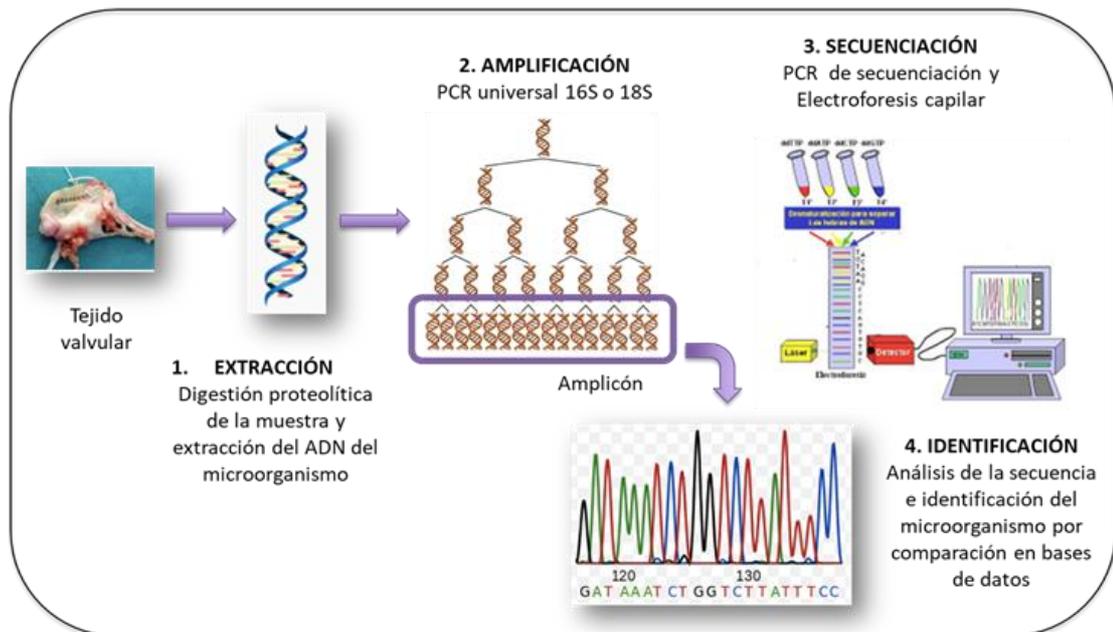


Figura 12. Procesamiento del tejido valvular.

### 3.7.1 Extracción de ADN a partir de tejido valvular

#### 3.7.1.1 Pretratamiento de las muestras y digestión proteolítica

##### Tejido

El tejido valvular o el tejido adherido a válvulas protésicas, cables o dispositivos, se fragmentó con bisturí sobre una placa de Petri estéril en condiciones asépticas y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5mL estéril. Posteriormente, se añadió tampón de digestión (Tris HCl 50mM, EDTA 1mM, SDS 0,5%, pH 8,5) y proteinasa K 20 mg/mL (QIAGEN®) en proporción 10:1. A continuación, las muestras se agitaron en vórtex y se incubaron a 56°C en un termomezclador Eppendorf® de 1400 rpm hasta su completa lisis (mínimo 2 h).

#### Prótesis y dispositivos intracardiacos

Las prótesis y los dispositivos se procesaron según el procedimiento de la Sociedad Española de Infecciosas y Microbiología Clínica<sup>102</sup> como se indica a continuación:

En el contenedor de la prótesis valvular o del dispositivo, se añadió un volumen de solución salina suficiente para cubrir la muestra en su totalidad. Se agitó en vórtex durante 30 segundos y después se introdujo en el baño sonicador a una frecuencia de 40 kHz durante 5 minutos. El caldo resultante de la sonicación se dividió en alícuotas de 10mL, que se centrifugaron 5 minutos a 3000xg. Con pipeta estéril se eliminó el sobrenadante de cada tubo, los sedimentos obtenidos se homogeneizaron mediante agitación en vórtex durante 30 segundos y se trasvasaron a un único tubo. Una cantidad 400µL del producto obtenido en la sonicación se sometió al proceso de digestión proteolítica, como se ha explicado previamente.

#### 3.7.1.2 Extracción del ADN

Tras el proceso de digestión proteolítica, se realizó la extracción de ADN en el equipo (QiaSymphony, QIAGEN®) utilizando el reactivo *QiaSymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit*, siguiendo el protocolo del fabricante. Se obtuvo una alícuota con el ADN extraído disuelto en 60µL de tampón de elución. Se determinó la concentración de ADN empleando el equipo NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific®) y se almacenó la alícuota -20°C hasta su uso.

## 3.7.2 PCR de amplio espectro y secuenciación

En el presente trabajo, para referirnos de manera abreviada a la técnica de PCR de amplio espectro seguida de secuenciación, se utilizará el término PCR universal. Como se ha descrito en la introducción, esta técnica consta de dos procesos: la amplificación de los genes diana y su posterior secuenciación.

## 3.7.2.1 Amplificación

Genes diana

En la Tabla 10 se indican los cebadores empleados, su secuencia, el gen diana que amplifican y el tamaño (pares de bases) de la secuencia amplificada.

Tabla 10. Genes diana y cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia 5´-3´	Gen diana	Tamaño de la secuencia amplificada (pb)
PSL (f)	AGG ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA	16S ARNr	500
P13P (r)	AGG CCC GGA ACG TAT TTC AC	16S ARNr	500
18S-1 (f)	ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG	18S ARNr	400
18S-2(r)	CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG	18S ARNr	400
βGlo (f)	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	B-globina humana	400
βGlo (r)	GGA AAA TAG ACC AAT AGG CAG	B-globina humana	400

Abreviaturas: (f)= *forward*; (r)= *reverse*; pb= pares de bases.

## c) PCR bacteriana de amplio espectro: Amplificación del gen 16S ARNr

Esta técnica se realizó en todos los tejidos valvulares, tanto del grupo de estudio como del grupo control. Para realizar la PCR del gen 16S ARNr se

### 3. Material y métodos

utilizaron los cebadores PSL(f) y P13P(r), descritos previamente por Xu *et al.*<sup>103</sup>, referidos en la Tabla 10.

#### d) PCR fúngica de amplio espectro: Amplificación del gen 18S ARNr

Se realizó en todas las válvulas de los pacientes del grupo control y en aquellos pacientes del grupo de estudio en los que se aislaron levaduras en el hemocultivo o en el cultivo valvular, o bien cuando los cultivos y la PCR del gen 16S ARNr resultaron negativos. Se amplificó la región 18S ARNr empleando los cebadores 18S-1 (f) y 18S -2 (r) descritos previamente por Einsele *et al.*<sup>104</sup>, indicados en la Tabla 10.

#### e) Control de extracción y amplificación: gen de la $\beta$ -globina humana

Con la finalidad de detectar fallos en la extracción de ADN e inhibiciones del proceso de amplificación, en cada muestra se amplificó el gen de la  $\beta$ -globina humana (cebadores  $\beta$ GloF y  $\beta$ BGloR)<sup>72</sup>, indicados en la Tabla 10. En los casos en los que no existió amplificación del gen  $\beta$ -globina humana se repitió la PCR diluyendo al décimo el ADN extraído para eliminar los posibles inhibidores. Ante resultados nuevamente negativos, se repitió el procedimiento de extracción del ADN de la muestra cuando fue posible. Si aun así no se consiguió obtener amplificación del gen de la  $\beta$ -globina, se consideró un resultado inválido.

#### Condiciones de la PCR

La PCR se diseñó con un volumen de reacción final de 50 $\mu$ L, empleando 10 $\mu$ L de ADN extraído y 40 $\mu$ L de *Master Mix*, cuya composición se recoge en la Tabla 11,

teniendo en cuenta el número de muestras, un control negativo y un control positivo.

Tabla 11. Reactivos utilizados para la técnica de PCR.

Reactivos (concentración)	μL por muestra
Cebador (f) (100 pmol/μL)	0,2
Cebador (r) (100 pmol/μL)	0,2
Mezcla de dNTPs (2,5 mM)	4
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	6
Tampón 10x	5
Agua libre de nucleasas	24,6
Taq polimerasa (5 UI/μL)	0,2

Abreviaturas: dNTPs= desoxinucleótidos.

La técnica se realizó en un termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Thermo Fisic Scientific®) con el siguiente programa de amplificación: 1) desnaturalización inicial 5 minutos a 94°C, seguido de 2) 40 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 min., anillamiento a 62°C durante 1 minuto y 3) elongación a 72°C durante 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos y refrigeración a 4°C.

#### Detección de amplicones

El producto de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando *peqGREEN dye*® como agente intercalante para permitir la visualización de las bandas. Se siguieron los siguientes pasos:

1. Preparación del gel de agarosa al 2%: se mezclaron 2 gramos de agarosa con 100mL solución tampón TBE 10x (Tris base, ácido bórico y EDTA) y se calentó hasta ebullición. Se dejó enfriar, se añadieron 6μL de *peqGREEN dye*® y se vertió en el molde del gel. Tras la solidificación de la agarosa, se introdujo el gel en la cubeta de electroforesis cubierto con tampón TBE 1x.

### 3. Material y métodos

2. Carga del gel de agarosa: se mezclaron 2  $\mu$ l de tampón de carga y 8  $\mu$ l de cada muestra amplificada y se depositaron en sendos pocillos del gel. En uno de los pocillos se cargó un marcador de peso molecular (Promega®).
3. Electroforesis del gel de agarosa: Se realizó la electroforesis del gel a 100V durante aproximadamente 25 minutos.
4. Visualización de las bandas de amplificación empleando un transiluminador ultravioleta. El peso molecular aproximado de las bandas amplificadas se determinó por comparación con las bandas del marcador. Los resultados de la PCR se consideraron válidos si no se detectó banda de amplificación en los controles negativos y se detectó el gen de la  $\beta$ -globina en todas las muestras. Los productos de PCR que mostraron una banda de 500 pb (en el caso del gen 16S) o 400 pb (en el caso del gen 18S), fueron sometidos al proceso de purificación previo a la PCR de secuenciación.

#### Purificación de los productos amplificados

Los *amplicones* obtenidos se purificaron empleando el reactivo *QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit* de QIAGEN®, según el protocolo del fabricante.

#### 3.7.2.2 Secuenciación

##### PCR secuenciación

Se realizó la PCR de secuenciación tipo Sanger empleando los mismos cebadores que en la PCR de amplificación pero a una concentración de 5 pmol/ $\mu$ L. Se utilizó el kit *GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start* (Beckman Coulter®) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### Purificación del producto de la PCR de secuenciación

El producto de la PCR de secuenciación se purificó en columnas empleando el reactivo *Performa DTR Gel Filtration Cartridges* (EdgeBio®), según las recomendaciones del fabricante.

#### Secuenciación

La secuenciación a partir del producto de la PCR de secuenciación purificado se llevó a cabo en el equipo *GenomeLab™ Genetic Analysis System* siguiendo el protocolo del fabricante.

#### Alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas se cotejaron en la web de *GenBank* a través del *software* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Para ello se introdujo la secuencia obtenida en formato FASTA en la sección correspondiente de la página web, [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), seleccionando la base de datos *Reference RNA sequences*.

El *software* proporciona el alineamiento de la secuencia introducida con las secuencias similares que se encuentran en la base de datos y se indica, entre otros parámetros, un porcentaje de similitud. Según los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute*<sup>63</sup>, los microorganismos se identifican a nivel de género cuando la similitud obtenida es  $\geq 97\%$ , y a nivel de especie cuando es  $\geq 99\%$ .

#### 3.7.3 PCR específicas

De forma complementaria y en respuesta a sospechas diagnósticas o serología positiva frente a un microorganismo relacionado con EI, en algunos casos se realizó la PCR específica en tejido valvular de *Coxiella burnetii*<sup>105</sup>, *Bartonella* spp<sup>106</sup> y *Tropheryma whipplei*<sup>107</sup>.

#### 3.8 Criterios de contaminación

En general, se catalogaron como falsos positivos y se consideraron contaminaciones los microorganismos detectados en los siguientes casos:

- Aislamiento de estafilococos coagulasa negativa o géneros relacionados, o *Cutibacterium acnes* en el cultivo valvular, a menos que el mismo microorganismo también se identificara por otra técnica microbiológica.
- Aislamiento de estafilococos coagulasa negativa o géneros relacionados, o *Corynebacterium* spp. en un solo frasco de hemocultivo, a menos que el mismo microorganismo también se identificara por otra técnica microbiológica.
- Aislamiento de estafilococos coagulasa negativa o enterococos en un solo cultivo de válvula, si hay otro patógeno identificado que podría explicar la EI.
- PCR universal positiva para *Streptococcus* spp. o bacilos gramnegativos no fermentadores si hay otro patógeno identificado que podría explicar la EI.

### 3.9 Análisis de datos

#### 3.9.1 Análisis descriptivo

Los parámetros utilizados para la descripción de nuestra muestra fueron: frecuencia porcentajes, media y desviación estándar. Se calcularon utilizando el programa de *software* Microsoft Excel® (Office 2016, Microsoft Corporation).

#### 3.9.2 Análisis de concordancia

El análisis de la concordancia entre los resultados obtenidos con las diferentes técnicas diagnósticas y el diagnóstico de EI según los Criterios de Duke modificados se realizó mediante: 1) procedimientos gráficos, empleando diagramas de Venn <https://www.meta-chart.com/venn#/display> y 2) el cálculo del índice de concordancia o coeficiente kappa de Cohen utilizando el programa SPSS® 12.5.

El índice kappa ( $\kappa$ ) representa la proporción de acuerdos observados más allá del azar respecto del máximo acuerdo posible más allá del azar.

$\kappa = (Po - Pe) / (1 - Pe)$ , siendo  $Po$  la proporción de acuerdos observados y  $Pe$  la proporción de acuerdos esperados en la hipótesis de independencia entre los observadores, es decir, de acuerdos por azar. La escala de valoración del índice  $\kappa$  se muestra en la Tabla 12<sup>108</sup>.

Tabla 12. Escala de valoración del índice  $\kappa$

<b>Kappa (<math>\kappa</math>)</b>	<b>Grado de acuerdo</b>
< 0,00	Sin acuerdo
0,00-0,20	Insignificante
0,21-0,40	Mediano
0,41-0,60	Moderado
0,61-0,80	Sustancial
0,81-1,00	Casi perfecto

#### 3.9.3 Análisis de los parámetros de validación

Para la validación de la técnica de PCR universal seguida de secuenciación sobre tejido valvular se consideraron los criterios de Duke modificados como patrón de referencia para el diagnóstico de EI y se determinaron los siguientes parámetros:

- Sensibilidad diagnóstica: proporción de los individuos enfermos que presentan la prueba positiva. Se obtienen al dividir el nº de individuos enfermos que presentan la prueba positiva (verdaderos positivos) entre la población enferma, formada por los verdaderos positivos (VP) y los falsos negativos (FN):

$$\text{Sensibilidad diagnóstica} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

- Especificidad diagnóstica: proporción de individuos sanos que presentan la prueba negativa. Se obtienen al dividir el nº de individuos sanos que presentan la prueba negativa (verdaderos negativos) entre la población sana, formada por los verdaderos negativos (VN) y los falsos positivos (FP):

$$\text{Especificidad diagnóstica} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

- Valor predictivo positivo (VPP): probabilidad de que un individuo que presenta la prueba positiva tenga la enfermedad. Corresponde al nº de individuos enfermos con prueba positiva dividido entre el nº de individuos que presentan la prueba positiva [VP/(VP+FP)].
- Valor predictivo negativo (VPN): probabilidad de que un individuo que presenta la prueba negativa no tenga la enfermedad. Corresponde al nº de individuos

sanos que presentan la prueba negativa dividido entre el nº de individuos totales que presentan la prueba negativa  $[VN/(VN+FN)]$ .

- Eficiencia diagnóstica de la técnica: proporción de individuos correctamente catalogados  $[(VP + VN) / (VP+VN+FP+FN)]$ .

Para el cálculo de estos parámetros se utilizó el programa de *software* Microsoft Excel®2016. Para estos valores se calculó también el intervalo de confianza del 95% empleando la web <http://vassarstats.net/clin1.html>.

#### 3.9.4 Análisis comparativo

La significación estadística de las diferencias entre los grupos se calculó mediante la prueba t de Student y ANOVA para comparar medias y proporciones. Para las tablas de contingencia se determinó la  $\chi^2$  de Pearson. Se consideró significativo un valor de p menor a 0,05. Para estos cálculos se utilizó el programa SPSS®12.5.

## **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Descripción de los pacientes y tipos de muestra

##### 4.1.1 Descripción de los pacientes

###### 4.1.1.1 Grupo de estudio

Durante el periodo de estudio se incluyeron de forma prospectiva un total de 69 pacientes con sospecha o diagnóstico clínico de EI que fueron intervenidos quirúrgicamente.

La edad media fue de 62,5 años (49,5-75,4) con una distribución por sexo de 46 hombres y 23 mujeres. El rango de edad de los pacientes fue similar en ambos sexos como muestra la Figura 13.

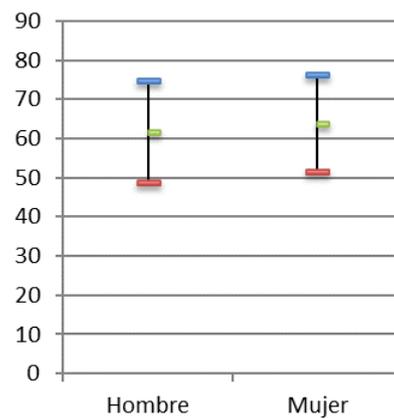


Figura 13. Distribución de la edad por sexo en los pacientes del grupo de estudio.

Según los criterios de Duke modificados, 52 episodios se categorizaron como EI definitiva, 2 se consideraron EI posible y en 15 casos se descartó el proceso infeccioso sobre el endocardio (Figura 14). Cabe señalar que 4 pacientes con EI definitiva tuvieron que ser reintervenidos, uno de ellos en dos ocasiones. En el presente estudio sólo se ha incluido el primer episodio de cada paciente.

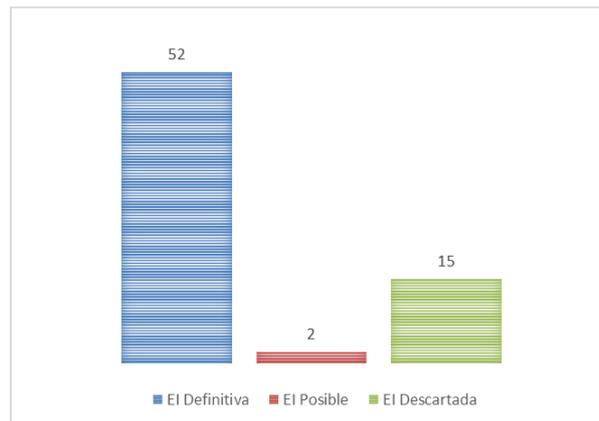


Figura 14. Clasificación del tipo de endocarditis en el grupo de estudio.

En el caso de los pacientes con EI definitiva, la media de edad fue de 62,1 años (48,7-75,5) y afectó a 34 hombres y a 18 mujeres.

Respecto al tratamiento antibiótico, en el momento de la cirugía todos los pacientes del grupo de estudio habían recibido tratamiento excepto dos (pacientes nº61 y nº68). De los 52 pacientes con EI definitiva, en 38 pacientes la duración del tratamiento era superior a los 5 días en el momento de la cirugía. Un paciente llevaba de 2 a 5 días de tratamiento y 13 pacientes llevaban 24 horas de terapia antimicrobiana. En cuanto a los pacientes con EI posible, el paciente nº53 llevaba más de 5 días con tratamiento y el paciente nº54 solo 24 horas.

De los 15 pacientes con EI descartada, en 4 de ellos la duración del tratamiento también fue superior a los 5 días, en 9 fue de 24 horas y 2 no llevaban tratamiento en el momento de la cirugía.

En el anexo 1 de los resultados se adjuntan las tablas de los pacientes del grupo de estudio. En ellas se detalla por paciente, además de los datos demográficos y el tipo de muestra, la etiología de la EI, el resultado del diagnóstico microbiológico clásico y molecular y el estudio anatomopatológico. También se especifica la contribución de la PCR universal seguida de secuenciación al diagnóstico.

#### 4.1.1.2 Grupo control

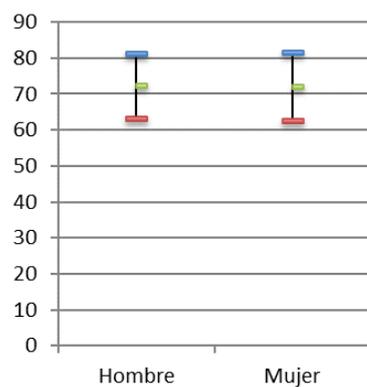


Figura 15. Distribución de la edad por sexo en los pacientes del grupo control.

Durante el periodo de estudio se incluyeron 42 pacientes en el grupo control con una media de edad de 71,1 años (63,1- 81,2) y con una distribución por sexo de 26 hombres y 16 mujeres. El rango de edad fue similar como muestra la Figura 15.

Estos pacientes fueron candidatos a cirugía valvular electiva por patología valvular.

Se descartó la EI en base a la ausencia de manifestaciones clínicas y de datos

ecocardiográficos sugestivos de infección. En el momento de la cirugía, el aspecto macroscópico de las piezas retiradas tampoco fue compatible con EI.

### 4.1.2 Descripción de los tipos de muestra

#### 4.1.2.1 Grupo estudio

En el grupo de estudio, 67 presentaron afectación valvular y en 2 casos se diagnosticó EI sobre dispositivo de estimulación cardiaca.

#### Válvula afectada

La Figura 16 muestra la válvula afectada en los 67 pacientes del grupo de estudio en los que se objetivó afectación valvular, diferenciando entre válvula nativa o protésica.

- En el caso de los 50 pacientes con EI definitiva en los que estaba afectada una de las válvulas, la endocarditis fue mayoritariamente sobre válvula aórtica (23), seguida de válvula mitral (14) y aórtica-mitral (8). Se describieron casos aislados de localización tricúspidea (2), tricúspide-mitral (2) y sobre válvula pulmonar (1).
- Los dos casos de EI posible se localizaron sobre válvula aórtica.
- En cuanto a las EI descartadas, la afectación principalmente fue sobre válvula mitral (8), seguido de válvula aórtica (5) y aórtica-mitral (2).

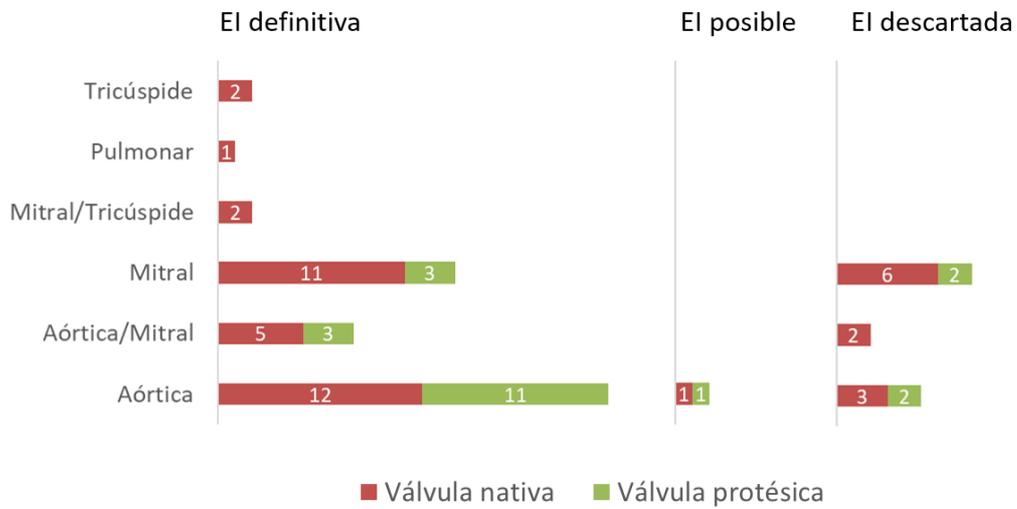


Figura 16. Válvula afectada en los pacientes del grupo de estudio.

Tipo de válvula afectada

La Figura 17 refleja la distribución de los diferentes tipos de válvula afectada (nativa, protésica o dispositivo de estimulación cardiaca) en los tres grupos de pacientes del grupo de estudio.

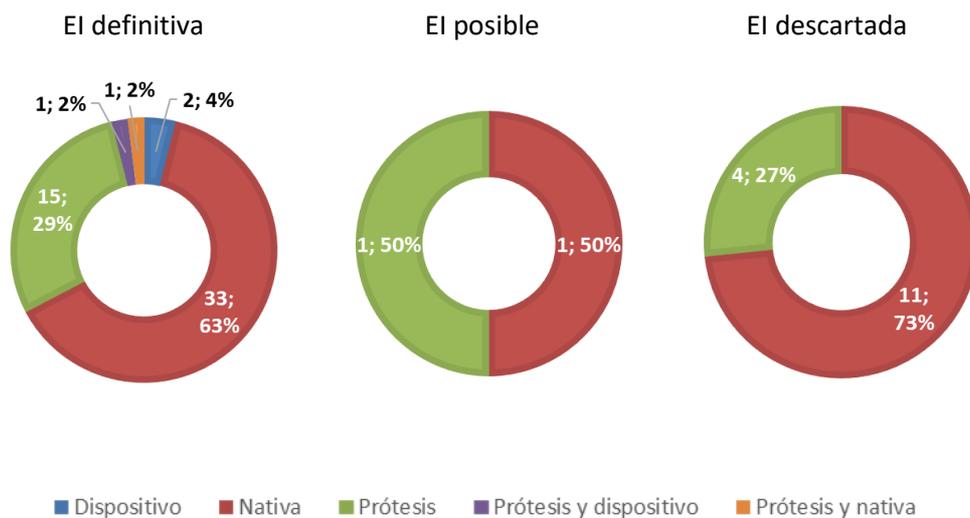


Figura 17. Tipo de válvula afectada en los pacientes del grupo de estudio.

- De los 52 episodios de EI definitiva, 33 (63%) correspondían a endocarditis sobre válvula nativa, en 15 pacientes (29%) estaba involucrada la válvula protésica y en 2 casos (4%) afectaba a dispositivos de estimulación cardiaca. También se recogieron dos casos con afectación mixta; uno de endocarditis sobre prótesis y dispositivo de estimulación cardiaca y otro sobre prótesis y válvula nativa.
- Los dos casos catalogados como EI posible afectaban a una válvula nativa y a otra protésica, respectivamente.
- Por último, de las EI descartadas, en 11 pacientes (73%) la alteración se localizó en la válvula nativa y en 4 pacientes (27%) en la válvula protésica.

### Número de muestras por paciente

Respecto al número de muestras en el grupo de estudio (Figura 18), se procesaron un total de 102 especímenes procedentes de los 69 pacientes. En 45 pacientes (65%) se recogió una sola muestra, en 18 casos (26%) se procesaron dos muestras y en 5 pacientes (7%) se procesaron 3 muestras. En un caso de EI definitiva sobre dispositivo se procesaron 6 muestras del mismo paciente.

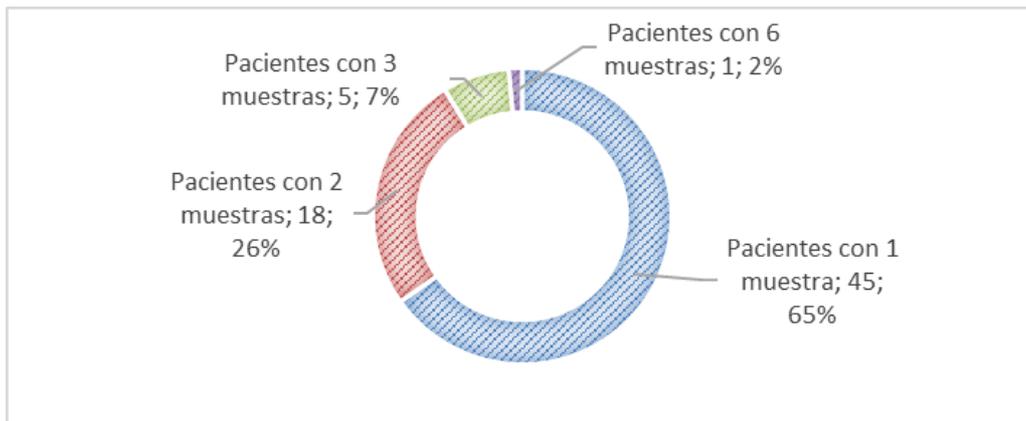


Figura 18. Número de muestras por paciente.

#### 4.1.2.2 Grupo control

En los pacientes del grupo control se procesaron únicamente válvulas nativas. Las válvulas afectadas fueron: válvula aórtica en 22 casos, válvula mitral en 19 y un caso en el que estaban afectadas la válvula aórtica y mitral (Figura 19).

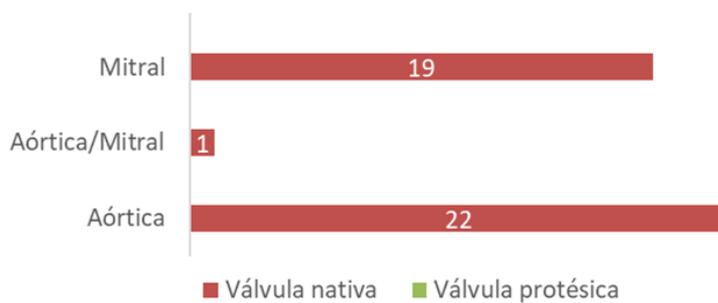


Figura 19. Válvula afectada en los pacientes del grupo control.

Se procesaron un total de 43 muestras de estos 42 pacientes.

## 4.2 Resultados del grupo de estudio

### 4.2.1 Diagnóstico microbiológico clásico del grupo de estudio

#### 4.2.1.1 Hemocultivo

La distribución de los resultados del hemocultivo en cada subgrupo del grupo de estudio está reflejada en la Figura 20.

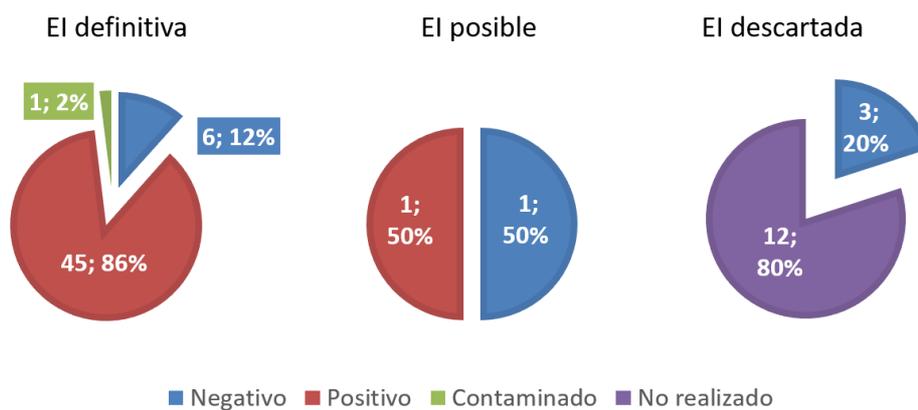


Figura 20. Distribución de los resultados del hemocultivo por subgrupo de estudio.

#### a) Resultados del hemocultivo en pacientes con El definitiva

Se realizaron hemocultivos a los 52 pacientes con El definitiva. En 45 de estos se obtuvo un aislamiento que fue considerado el agente causal de la endocarditis. Los microorganismos aislados fueron: *Staphylococcus aureus* (16), *Staphylococcus epidermidis* (7), *Staphylococcus capitis* (1), *Staphylococcus cohnii* (1), *Enterococcus faecalis* (4), *Streptococcus gallolyticus* (2), *Streptococcus mitis/oralis* (2), *Streptococcus anginosus* (1), *Streptococcus gordonii* (1), *Streptococcus pneumoniae* (2), *Streptococcus sanguinis* (1), *Streptococcus* no tipificados (*grupo viridans*) (4), y

*Candida parapsilosis* (1). Hubo un hemocultivo en el que se aislaron *Candida auris* (1) y *Staphylococcus haemolyticus* (1) (Figura 21).

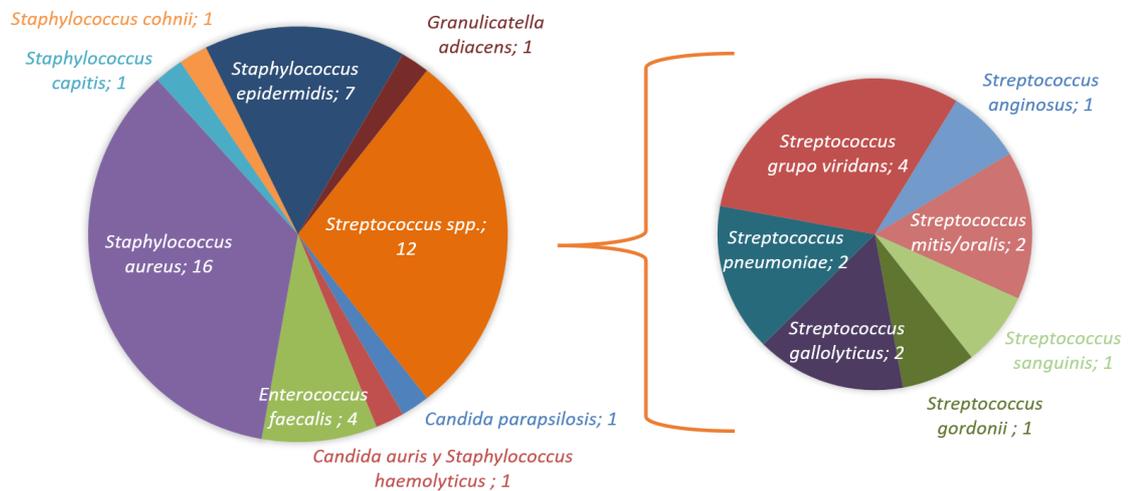


Figura 21. Microorganismos aislados en el hemocultivo de pacientes con EI definitiva.

El porcentaje de hemocultivos en los que no se consiguió determinar el agente causal de la EI fue del 13,5 %. Es decir, no se obtuvo aislamiento en el hemocultivo de 6 pacientes. En 4 de estos casos el agente causal se determinó por otras técnicas: *Fusarium solani* (paciente nº46), *Haemophilus parainfluenzae* (paciente nº47), *Streptococcus gallolyticus* (paciente nº48) y *Coxiella burnetii* (paciente nº52). En dos casos con diagnóstico de EI definitiva y hemocultivo negativo no se consiguió determinar el agente causal por ninguna otra técnica microbiológica (pacientes nº49 y 50).

Por último, en el hemocultivo del paciente nº52 se aislaron, en un único frasco, dos microorganismos: *Corynebacterium coyleae* y *Staphylococcus hominis*. El hecho de

que se trate de bacterias presentes en la microbiota cutánea y que se detectaran en un único frasco, hace pensar en una posible contaminación en el momento de la toma de la muestra. Por ello se descartó el resultado del hemocultivo como un criterio menor de Duke. En este paciente tampoco se pudo filiar la EI.

b) Resultados del hemocultivo de pacientes con EI posible

El hemocultivo se procesó en 1 de los 2 pacientes con EI posible y se aisló *Staphylococcus hominis* (paciente nº53).

c) Resultados del hemocultivo de pacientes con EI descartada

En este grupo de 15 pacientes sólo se realizó el hemocultivo a 3 pacientes y el resultado fue negativo.

4.2.1.2 Cultivo de tejido valvular

La Figura 22 refleja la distribución de los resultados del cultivo de tejido valvular (positivo, negativo o contaminado) según el subgrupo de estudio.



Figura 22. Distribución de los resultados del cultivo del tejido valvular por subgrupo de estudio.

a) Resultados del cultivo de tejido valvular en pacientes con EI definitiva

De los 52 pacientes con EI definitiva, 35 pacientes tuvieron todos los cultivos negativos. En 4 pacientes se consideró el cultivo contaminado y en 13 pacientes se consiguió el aislamiento del agente causal (Figura 22).

Se realizó el cultivo del tejido valvular de 75 muestras procedentes de los 52 pacientes con EI definitiva. En 56 muestras pertenecientes a 35 pacientes el cultivo resultó negativo. En 4 muestras de 4 pacientes (nº39, nº44, nº45 y nº51), el aislamiento se consideró contaminación ya que se dio más valor al microorganismo detectado por medio de otra técnica diagnóstica (hemocultivo, PCR o serología).

En 15 muestras de 13 pacientes el cultivo fue positivo y se aisló el agente causal de la EI. La distribución de los resultados de cultivo por muestra se refleja en la Figura 23.

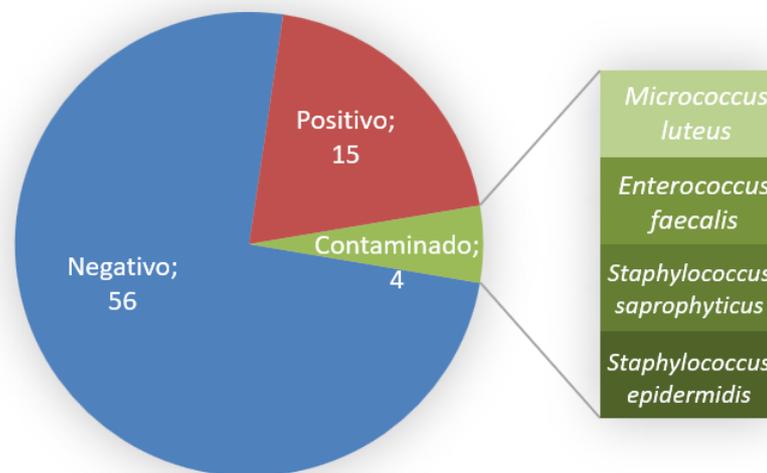


Figura 23. Resultado de cultivo de tejido valvular por muestra en pacientes con EI definitiva.

La Figura 24 representa la distribución de los microorganismos aislados en los cultivos de tejido valvular positivos de los pacientes con EI definitiva.

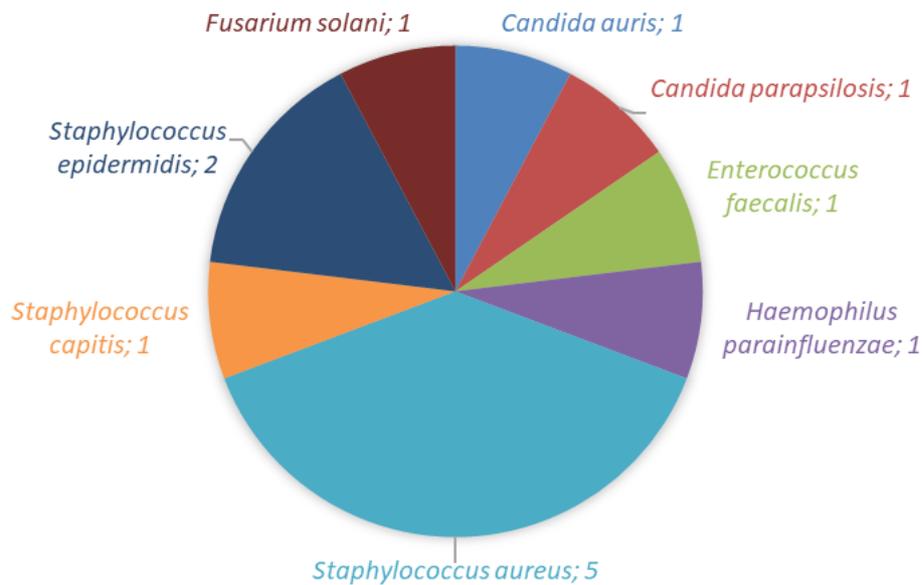


Figura 24. Microorganismos aislados en el cultivo de tejido valvular en pacientes con EI definitiva.

b) Resultados del cultivo de tejido valvular en pacientes con EI posible

El resultado del cultivo en este grupo fue negativo en un paciente y en el otro se aisló el posible agente causal, *Streptococcus anginosus* (paciente nº54).

c) Resultados del cultivo de tejido valvular en pacientes con EI descartada

De los 15 pacientes en los que se descartó EI, el cultivo fue negativo en 12 de ellos y se consideró contaminado en 3 (Figura 22).

Se cultivaron 17 muestras de estos 15 pacientes; 14 muestras de 12 pacientes fueron negativas y 3 muestras de 3 pacientes se consideraron contaminadas. En

estas muestras se aisló *Kokuria palustris* (1), *Staphylococcus epidermidis* (1) y *Staphylococcus hominis* (1).

#### 4.2.1.3 Tinción de Gram de tejido valvular

La tinción de Gram se informó en 53 de los 69 pacientes del grupo de estudio. En 16 pacientes se observaron microorganismos, en 11 pacientes se observaron leucocitos pero no microorganismos y en 26 pacientes no se observaron ni microorganismos ni leucocitos.

##### a) Tinción de Gram de tejido valvular en pacientes con EI definitiva

En 15 de 41 pacientes (36,6%) se observaron microorganismos en la tinción de Gram de muestra directa.

En 11 casos sólo se observaron leucocitos y en 15 casos no se observaron ni microorganismos ni leucocitos.

##### b) Tinción de Gram de tejido valvular en pacientes con EI posible

De los dos pacientes con EI posible, en uno ellos se observaron únicamente microorganismos en la tinción de Gram y en el otro no se observaron leucocitos ni microorganismos.

##### c) Tinción de Gram de tejido valvular en pacientes con EI descartada

Se registró el resultado de la tinción de Gram en 10 de los 15 pacientes en los que se descartó la EI. En ningún caso se observaron leucocitos ni microorganismos.

## 4.2.2 Diagnóstico microbiológico molecular del grupo de estudio

De los 52 pacientes con EI definitiva, se detectó el agente causal mediante la técnica de la PCR universal seguida de secuenciación en 42 casos. En el caso de las EI posibles, el diagnóstico molecular fue positivo en 1 de los 2 pacientes. Por último, en los pacientes con EI descartada, se detectó un microorganismo por PCR universal seguida de secuenciación en 3 de los 15 casos (Figura 25).

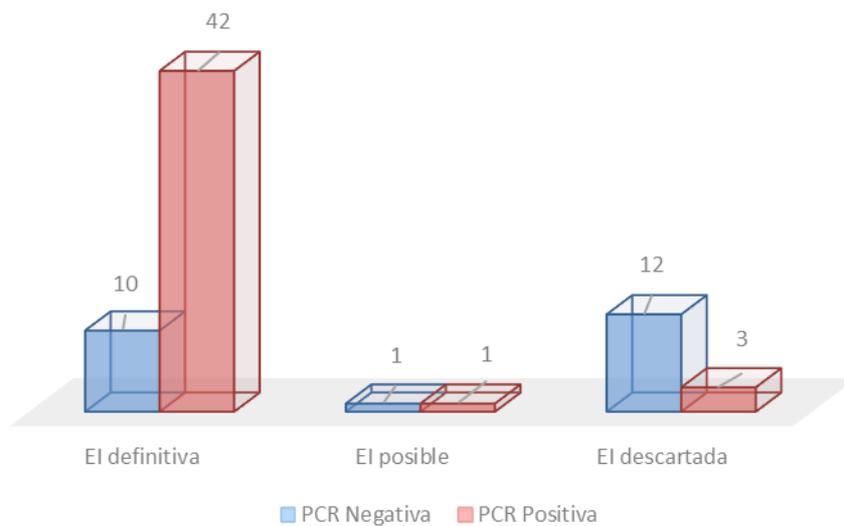


Figura 25. Resultado de la técnica de PCR universal en cada subgrupo del grupo de estudio.

## 4.2.2.1 PCR universal y secuenciación en pacientes con EI definitiva.

Se identificó el agente causal empleando la PCR universal seguida de secuenciación en 42 de los 52 casos de EI definitiva. Los microorganismos identificados fueron: *Staphylococcus aureus* (12), *Staphylococcus epidermidis* (3), *Staphylococcus capitis* (1), *Enterococcus faecalis* (4), *Haemophilus parainfluenzae* (1), *Staphylococcus* spp. (4), *Granullicatella* spp. (1), *Streptococcus* spp. (4), *Streptococcus mutans* (1), *Streptococcus mitis/oralis* (1), *Streptococcus anginosus* (2), *Streptococcus*

*gallolyticus* (2), *Streptococcus pseudopneumoniae* (1), *Candida parapsilosis* (1) *Candida auris* (1) y *Fusarium* spp. (1) (Figura 26).

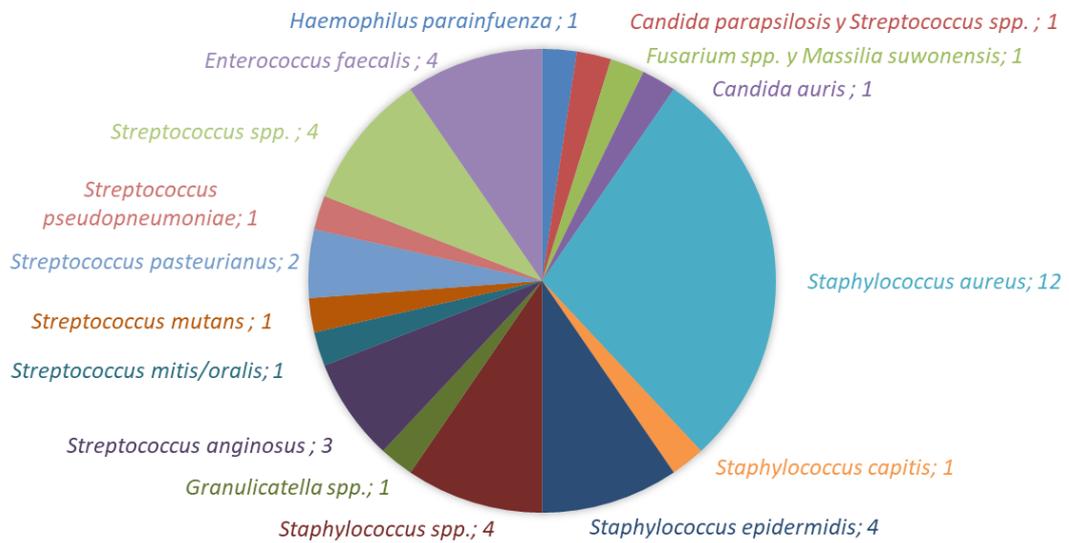


Figura 26. Microorganismos identificados por PCR universal en pacientes con EI definitiva.

a) Resultados de la técnica de PCR universal del gen 16S y secuenciación por muestra en pacientes con EI definitiva.

Se realizó esta técnica en 83 muestras pertenecientes a los 52 pacientes con EI definitiva.

- En 56 muestras de 42 pacientes amplificó el gen 16S y se identificó el amplicón por secuenciación.
- En dos casos de pacientes con EI fúngica se detectaron resultados positivos de la técnica de amplificación del gen 16S; se detectó *Massilia suwonensis* en un paciente con EI por *Fusarium solani* (paciente nº46) y *Streptococcus* spp. en un paciente con EI por *Candida parapsilosis* (paciente nº3).

#### 4. Resultados

- En 7 muestras de 4 pacientes se amplificó el gen 16S, pero no se consiguió identificar el amplicón por secuenciación. Tres muestras pertenecían a 2 pacientes que tuvieron otra muestra con PCR positiva. Las otras 4 muestras pertenecían a 2 pacientes en los que no se identificó el agente causal por técnicas moleculares en ninguna muestra.
  - No se amplificó el gen 16S ARNr en 21 muestras de 16 pacientes; 9 muestras pertenecían a 7 pacientes en los que se procesó otra muestra que resultó positiva. Restan 12 muestras de 9 pacientes en los que la biología molecular tampoco consiguió realizar una identificación.
- b) Resultados de la técnica de PCR universal del gen 18S ARNr y secuenciación por muestra en pacientes con EI definitiva.
- Se realizó esta técnica en 25 muestras de 13 pacientes y resultó positiva en 6 muestras correspondientes a 3 pacientes con EI fúngica. En este caso no se detectaron resultados falsos positivos.

#### Resultados de la PCR universal según la duración del tratamiento antibiótico

De 38 pacientes con EI definitiva en los que la duración del tratamiento fue superior a los 5 días en el momento de la cirugía, 31 (81,6%) presentaron la PCR universal positiva. En el paciente que llevaba de 2 a 5 días de tratamiento también se obtuvo un resultado positivo en la PCR universal. En el caso de 13 pacientes que llevaban 24 horas de terapia antimicrobiana, 10 (76.9%) presentaron la PCR universal positiva.

### Resultados de la PCR universal según el número de muestras por paciente

De los 29 pacientes en los que sólo se remitió una muestra al laboratorio, la PCR universal fue positiva en 24 (82,8%). En los pacientes en los que se remitieron 2 muestras a laboratorio o bien se procesó por separado tejido periprotésico y sonicado, la PCR universal resultó positiva al menos en una de las muestras en 14 de los 18 pacientes (77.8%). Se remitieron 3 muestras por paciente en 4 casos, y en 3 pacientes (75%) se obtuvo un resultado positivo de la PCR universal en alguna muestra.

#### 4.2.2.2 PCR específica en pacientes con EI definitiva

En algunos pacientes en los que la PCR universal fue negativa, se realizaron PCR específicas de *Tropheryma whipplei*, *Coxiella burnetii* o *Bartonella* spp. en muestras valvulares.

- En el paciente nº49, en el que ninguna de las técnicas microbiológicas descritas consiguió determinar el agente causal, la PCR específica de *Tropheryma whipplei* fue positiva.
- En el paciente nº50, las PCR específicas de *Tropheryma whipplei*, *Bartonella* y *Coxiella burnetii* resultaron negativas.
- El paciente nº51, diagnosticado por serología de EI por *Coxiella burnetii*, la PCR universal resultó negativa. Se procesó entonces la PCR específica de *Coxiella burnetii*, y también resultó negativa.

### 4.2.2.3 PCR universal y secuenciación en pacientes con EI posible

De los 2 casos catalogados como EI posible, la PCR universal seguida de secuenciación fue positiva en un caso en el que se identificó *Streptococcus anginosus* (paciente nº54).

### 4.2.2.4 PCR universal y secuenciación en pacientes con EI descartada.

En los 15 pacientes en los que por criterios de Duke se descartó la EI, se detectó *Streptococcus* spp. mediante técnicas moleculares en 3 casos. Dos de estos pacientes presentaban antecedentes de EI por *Streptococcus* spp. (pacientes nº56 y nº57).

a) Resultados de la técnica de PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación por muestra en pacientes con EI descartada.

Se realizó esta técnica en 17 muestras de 15 pacientes.

- En 3 muestras de 3 pacientes se amplificó el gen 16S ARNr y se identificó el amplicón por secuenciación.
- En una muestra de un paciente se amplificó el gen 16S ARNr, pero no se consiguió identificar el amplicón por secuenciación.
- En 13 muestras de 11 pacientes no se amplificó el gen 16S ARNr.

b) Resultados de la técnica de PCR universal del gen 18S ARNr y secuenciación por muestra en pacientes con EI descartada.

Se realizó esta técnica en 10 muestras pertenecientes a 10 pacientes y en ningún caso se amplificó el gen 18S.

#### 4.2.3 Comparación del diagnóstico microbiológico molecular con el diagnóstico microbiológico clásico.

La Tabla 13 recoge los resultados del diagnóstico microbiológico completo, clásico y molecular, de los pacientes con EI definitiva, posible y descartada.

Tabla 13. Resultados de las distintas técnicas de microbiología según el subgrupo de estudio.

Definición de EI (Criterios de Duke modificados)	Cultivo bacteriológico de muestra valvular			PCR universal y secuenciación		Hemocultivo		
	P	N	C	P	N	P	N	NR
EI definitiva (n=52)	13	35	4	42	10	45	7	0
EI descartada (n=15)	0	12	3	3	12	0	3	12
EI posible (n=2)	1	1	0	1	1	1	0	1
Total (n=69)	14	48	7	46	23	46	10	13

Leyenda: P=Positivo; N=Negativo; C=Contaminado; NR=No realizado.

##### 4.2.3.1 Comparación del diagnóstico microbiológico clásico y molecular en pacientes con EI definitiva

El diagnóstico microbiológico completo, incluyendo hemocultivo, cultivo valvular, serología, PCR universal y PCR específica, consiguió determinar la etiología en 50 de los 52 casos de EI definitiva. La Figura 27 muestra la distribución del agente causal de la infección en estos pacientes y se indica el porcentaje de EI no filiadas, (4%).

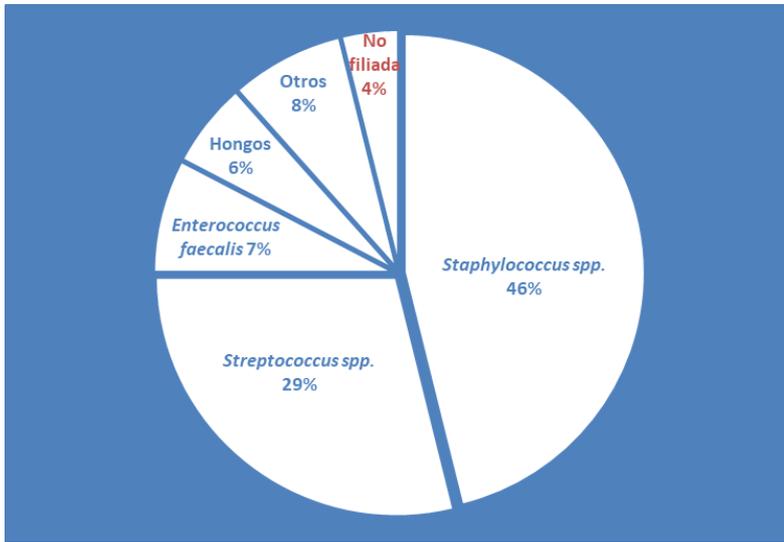


Figura 27. Etiología de los casos de EI definitiva.

La distribución de los resultados obtenidos mediante cultivo de tejido valvular, PCR universal seguida de secuenciación y hemocultivo en pacientes con EI definitiva, está representada en la Figura 28.

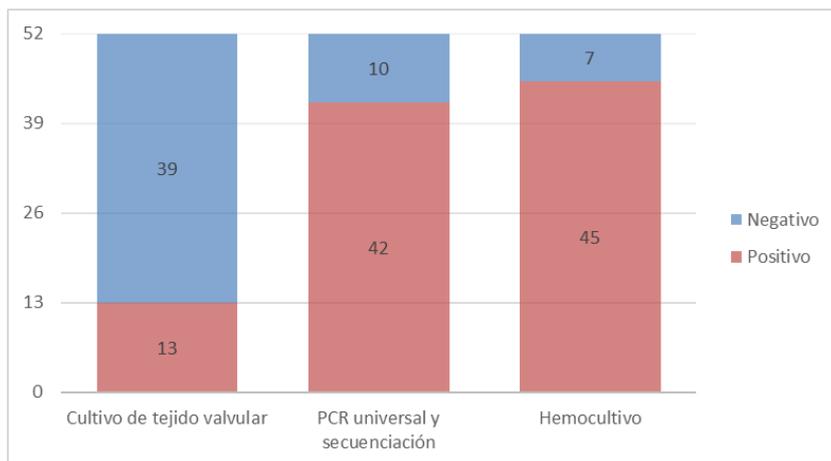


Figura 28. Resultados globales de las diferentes técnicas de diagnóstico microbiológico.

La Figura 29 recoge el número de pruebas positivas por las diferentes técnicas diagnósticas y el número de pruebas positivas que coinciden con las principales técnicas de diagnóstico microbiológico en los casos de EI definitiva.

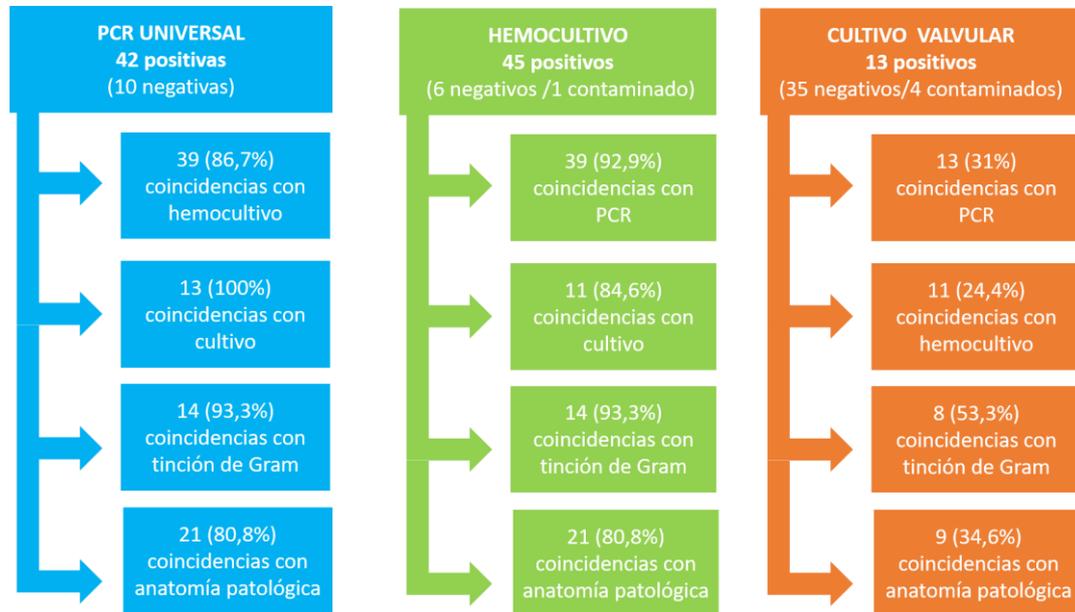


Figura 29. Resultados positivos por las diferentes técnicas diagnósticas y porcentaje de coincidencia con la PCR universal, el hemocultivo y el cultivo valvular en pacientes con EI definitiva.

La

Figura 30 muestra los resultados de las técnicas microbiológicas de diagnóstico clásico y molecular en cada uno de los 52 pacientes diagnosticados de EI definitiva según los criterios de Duke modificados. Incluye también el estudio anatomopatológico.

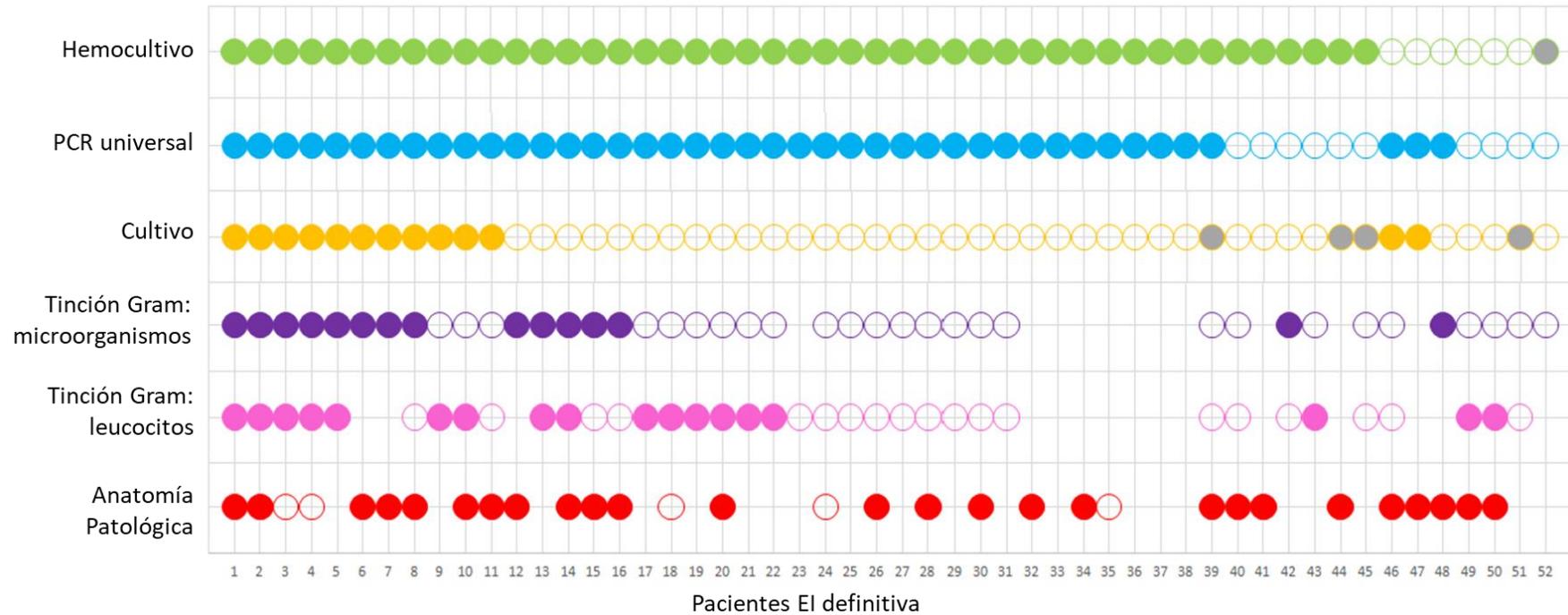


Figura 30. Detalle por paciente de los resultados de las principales técnicas de diagnóstico empleadas en pacientes con EI definitiva.

Leyenda: Círculos coloreados=resultado de la prueba positivo; Círculos sin colorear=resultado de la prueba negativo; Círculos grises=resultado no valorable por contaminación.

Comparación de la PCR universal con el hemocultivo

La Figura 31 muestra la concordancia entre los resultados positivos obtenidos con el hemocultivo y con la técnica de PCR universal seguida de secuenciación en tejido valvular.

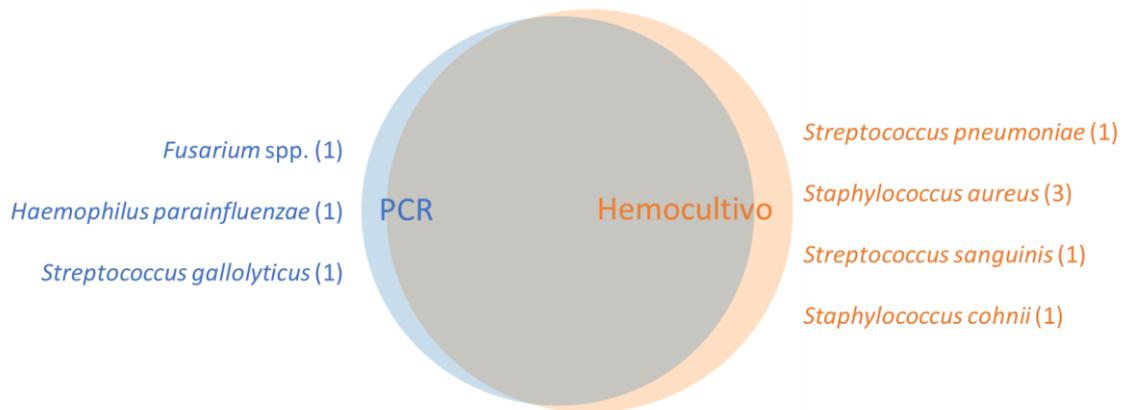


Figura 31. Concordancia de los resultados positivos de la PCR universal y el hemocultivo en pacientes con EI definitiva.

- En el grupo de EI definitiva, el microorganismo aislado en el hemocultivo coincidió con el resultado de la PCR universal seguida de secuenciación en 39 de los 52 pacientes (área gris de la Figura 31).
- Las técnicas moleculares resultaron negativas en 6 casos en los que sí que se determinó el agente causal por medio del hemocultivo (área naranja de la Figura 31): *Streptococcus pneumoniae* (paciente nº40), *Staphylococcus aureus* (pacientes nº41, 43 y 44), *Streptococcus sanguinis* (paciente nº42) y *Staphylococcus cohnii* (paciente nº45).
- Por otro lado, de los seis pacientes en los que el resultado del hemocultivo fue negativo, en 3 casos se consiguió identificar el microorganismo responsable de la EI por PCR universal seguida de secuenciación (área azul de la Figura 31):

*Fusarium* spp. (paciente nº46), *Haemophilus parainfluenzae* (paciente nº47) y *Streptococcus gallolyticus* (paciente nº48).

- Restan 4 pacientes con EI definitiva en los que ni el hemocultivo ni la PCR universal seguida de secuenciación consiguieron detectar el agente causal de la EI. En 3 pacientes tanto el hemocultivo como las técnicas moleculares resultaron negativas. En uno de estos pacientes el diagnóstico etiológico se realizó por serología de *Coxiella burnetii* (paciente nº51) y los dos casos restantes no se consiguieron filiar (pacientes nº49 y 50). Por último, en un paciente el resultado del hemocultivo se consideró contaminación y tampoco se detectó ningún microorganismo por las técnicas moleculares (paciente nº52).

#### Concordancia de la PCR universal con el cultivo de tejido valvular

La Figura 32 muestra la concordancia entre los resultados positivos obtenidos del cultivo del tejido valvular, del hemocultivo y por la técnica de PCR universal seguida de secuenciación en tejido valvular.

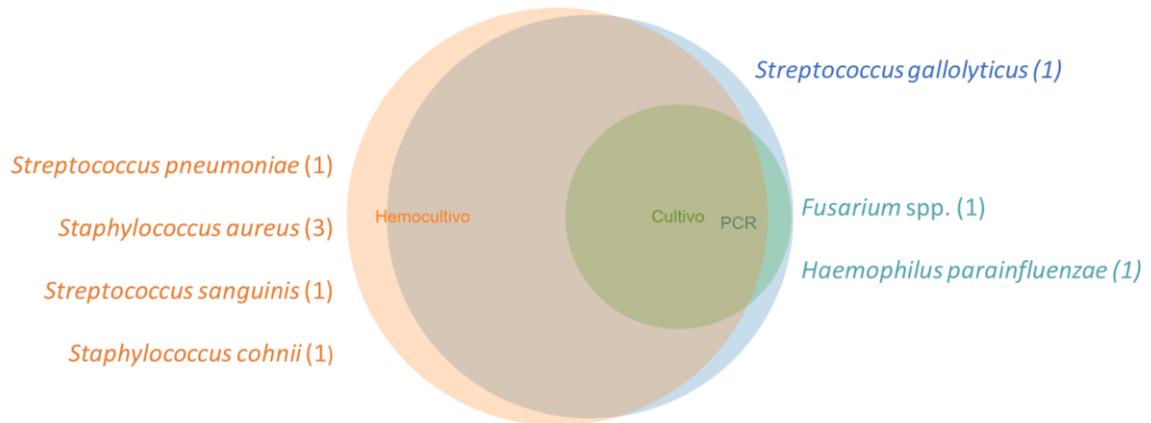


Figura 32. Concordancia de los resultados positivos de la PCR universal, el cultivo de tejido valvular y el hemocultivo en pacientes con EI definitiva.

- En el grupo de EI definitiva, se detectó el agente causal por PCR universal seguido de secuenciación en todos los casos en los que el cultivo de válvula fue positivo (13). En 11 de estos 13 pacientes este resultado coincidió con el hemocultivo (área gris verdosa de la Figura 32). Cabe resaltar que en dos casos se determinó el agente causal únicamente mediante las técnicas moleculares y el cultivo: *Fusarium* spp. (paciente nº46) y *Haemophilus parainfluenzae* (paciente nº47) (área turquesa de la Figura 32).
- Respecto a los 35 pacientes con cultivos de válvula negativos, se identificó el agente causal por biología molecular en 28 casos, 27 de los cuales coincidieron con el aislamiento del hemocultivo (área gris de la Figura 32). Cabe destacar un paciente con EI por *Streptococcus gallolyticus* en el que el diagnóstico etiológico fue exclusivamente por PCR universal seguido de secuenciación (paciente nº48). En este paciente, tanto el hemocultivo como el cultivo de tejido valvular resultaron negativos (área azul de la Figura 32).

- Por último, de los 4 pacientes con cultivo de tejido contaminado, en uno de ellos (paciente nº47) se detectó el agente causal por PCR (*Streptococcus* spp.), coincidiendo con el aislamiento del hemocultivo. En los otros 3 pacientes con cultivo contaminado, la PCR universal seguida de secuenciación fue negativa y el diagnóstico microbiológico fue por hemocultivo (pacientes nº44 y nº45) y por serología (paciente nº51).

##### Comparación de la PCR universal con la tinción de Gram de tejido valvular

###### a) Pacientes en los que se observaron microorganismos en la tinción de Gram

En 15 pacientes con EI definitiva se observaron microorganismos en la tinción de Gram. En 13 de estos pacientes también fue positivo el hemocultivo y el diagnóstico molecular. En un paciente sólo fue positivo el hemocultivo (paciente nº42) y en otro sólo fue positiva la PCR universal seguida de secuenciación (paciente nº48).

###### b) Pacientes en los que no se observaron microorganismos en la tinción de Gram

En 11 pacientes con EI definitiva no se observaron microorganismos en la tinción de Gram, pero sí que se objetivó la presencia de leucocitos. El hemocultivo y la PCR universal seguida de secuenciación tuvieron un resultado positivo en 9 de estos 12 pacientes.

En un caso en el que se observaron leucocitos, pero no microorganismos en la tinción de Gram, únicamente el hemocultivo resultó positivo (paciente nº43). En los dos últimos pacientes de este grupo, se observaron abundantes leucocitos en la tinción de Gram (pacientes nº49 y nº50) pero ninguna otra prueba de diagnóstico microbiológico fue positiva.

c) Pacientes en los que no se observaron microorganismos ni leucocitos en la tinción de Gram

En 15 pacientes no se observaron microorganismos ni leucocitos en la tinción de Gram. En todos estos pacientes se consiguió determinar el agente causal por alguna técnica microbiológica; en 11 casos, tanto el hemocultivo como la PCR universal fueron positivos, en 2 sólo el hemocultivo resultó positivo, en 1 sólo caso la PCR universal fue positiva y el paciente que resta fue diagnosticado por serología de *Coxiella burnetii*.

### 4.2.3.2 Comparación del diagnóstico microbiológico clásico y molecular en pacientes con El posible

En el paciente nº53 el resultado de la PCR universal seguida de secuenciación fue negativo, lo que coincidió con el resultado del cultivo y la tinción de Gram, en la que no se observaron microorganismos ni leucocitos. En el hemocultivo, sin embargo, se aisló *Staphylococcus hominis* en cuatro frascos, por lo no se consideró un contaminante.

En el paciente nº54 el resultado de la PCR universal seguida de secuenciación fue positiva y se detectó *Streptococcus anginosus*. Este resultado coincidió con el cultivo de tejido valvular y la tinción de Gram, en la que se observaron cocos grampositivos. El hemocultivo no se procesó en este paciente.

### 4.2.3.3 Comparación del diagnóstico microbiológico clásico y molecular en pacientes con EI descartada

#### a) Pacientes con EI descartada en los que la PCR universal fue negativa

El resultado de la PCR universal seguida de secuenciación fue negativo en 12 de los 15 pacientes en los que por criterios de Duke se descartó la EI. En estos 12 pacientes, el cultivo también fue negativo excepto en los pacientes nº68 y nº69 en los que se aislaron *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis* respectivamente. Estos aislamientos se consideraron contaminación en base a los datos clínicos, corroborados por el resultado negativo de la PCR de amplio espectro. Respecto al hemocultivo, sólo se realizó en 2 de estos 12 pacientes y en ambos casos fue negativo.

#### b) Pacientes con EI descartada en los que la PCR universal fue positiva

Se detectó *Streptococcus* spp. mediante técnicas moleculares en 3 de los 15 casos de EI descartada. Dos de estos pacientes presentaban antecedentes de EI por *Streptococcus* spp. (pacientes nº56 y nº57). En el paciente nº56, los resultados del cultivo de tejido valvular y del hemocultivo fueron negativos. En el paciente nº57, no se realizó el hemocultivo y en el cultivo valvular se aisló *Kocuria palustris*, que fue considerado una contaminación.

En el paciente nº60 también se detectó *Streptococcus* spp. por PCR universal. En este caso, el cultivo fue negativo y el hemocultivo no se realizó. Este paciente no presentaba antecedentes conocidos de EI, por lo que el resultado de la PCR universal se consideró un falso positivo.

### 4.2.4 Estudio anatomopatológico del grupo de estudio. Comparación con el diagnóstico microbiológico clásico y molecular

Se realizó el estudio anatomopatológico en 37 casos: 31 pacientes diagnosticados de EI definitiva y 6 pacientes en los que se descartó la infección. En los casos catalogados como EI posible no se remitieron muestras para estudio histológico.

#### 4.2.4.1 Comparación del estudio anatomopatológico y el diagnóstico microbiológico en pacientes con EI definitiva.

Como se ha indicado, se realizó el estudio anatomopatológico en 31 de los 52 pacientes diagnosticados de EI definitiva. El detalle de los resultados de anatomía patológica por paciente y comparado el diagnóstico microbiológico está reflejado en la

Figura 30.

##### a) Estudio anatomopatológico compatible con EI

En 26 pacientes se observó en la muestra lesiones compatibles con EI: presencia de signos de EI o presencia de microorganismos (en 20 pacientes) y observación de células inflamatorias (en 6 pacientes).

Se objetivó concordancia entre los resultados positivos de anatomía patológica, técnicas moleculares y hemocultivo en 18 de estos 26 pacientes. En 3 pacientes la PCR fue negativa pero el estudio anatomopatológico y el hemocultivo resultaron positivos (pacientes nº40, nº41 y nº44). Por otro lado, el hemocultivo fue negativo pero la PCR resultó positiva en 3 casos con estudio anatomopatológico positivo (pacientes nº46, nº47 y nº48).

Por último, en dos pacientes el resultado de anatomía patológica fue positivo, pero no se consiguió determinar el agente causal mediante ninguna técnica

microbiológica (pacientes nº49 y nº50). En ambos casos se apreciaron signos de endocarditis y células inflamatorias en el estudio anatomopatológico. Este resultado concuerda con la tinción de Gram, en la que se observaron abundantes leucocitos.

### b) Estudio anatomopatológico no compatible con EI

En 5 casos no se observaron signos de endocarditis ni células inflamatorias en el estudio anatomopatológico. Sin embargo, el resultado de la PCR y del hemocultivo fue positivo (pacientes nº3, nº4, nº18, nº24 y nº35).

#### 4.2.4.2 Comparación del estudio anatomopatológico y el diagnóstico microbiológico en pacientes con EI descartada

Se realizó el estudio de anatomía patológica en 6 de los 15 pacientes con EI descartada.

### a) Estudio anatomopatológico compatible con EI

Se identificaron células inflamatorias en 3 de los 6 pacientes, aunque no se describieron signos específicos de EI. En estos 3 pacientes, el cultivo de tejido valvular y la PCR resultaron negativos y en la tinción de Gram no se observaron ni leucocitos ni microorganismos.

### b) Estudio anatomopatológico no compatible con EI

El resultado de anatomía patológica fue negativo en los otros 3 pacientes. Este resultado concuerda con la tinción de Gram en la que no se observaron leucocitos ni microorganismos. En dos de los casos la PCR también fue negativa y el hemocultivo no se realizó. El tercer caso, en el que el hemocultivo fue negativo

pero se detectó *Streptococcus* spp. por técnicas moleculares, se trataba de un paciente que presentó un cuadro de EI por *Streptococcus mitis/oralis* 5 meses antes (paciente nº56).

### 4.3 Resultados del grupo control

#### 4.3.1 Diagnóstico microbiológico clásico del grupo control

El cultivo bacteriológico resultó estéril en 39 de las 43 muestras del grupo control. En 4 casos el cultivo fue positivo y se aisló *Staphylococcus epidermidis* (2) y *Cutibacterium acnes* (2), que se consideraron contaminación en base a los datos clínicos. La tinción de Gram se realizó en todas las muestras y no se observaron microorganismos en ningún caso, aunque se observaron leucocitos aislados en 3 casos.

En estos pacientes no estaba indicada la recogida de hemocultivos ni el tratamiento antibiótico.

#### 4.3.2 Diagnóstico microbiológico molecular del grupo control

La PCR 16S y la PCR 18S seguida de secuenciación resultó negativa en todas las muestras de los pacientes del grupo control.

#### 4.3.3 Estudio anatomopatológico del grupo control

En ninguna de las 43 muestras de los pacientes del grupo control se apreciaron signos de EI ni células inflamatorias en el estudio anatomopatológico.

#### 4.4 Análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia.

##### 4.4.1 Sensibilidad y especificidad de las técnicas microbiológicas

Se utilizó como patrón de referencia el diagnóstico de EI según los criterios de Duke modificados. En el grupo de EI definitivas se incluyeron los 52 pacientes del grupo de estudio. En el grupo de EI descartadas se incluyeron los 42 pacientes del grupo control y 13 pacientes del grupo de estudio [se excluyeron los dos pacientes con EI descartada que presentaban antecedentes de EI por *Streptococcus* spp. en los que se detectó este microorganismo por las técnicas moleculares (pacientes nº56 y nº60)].

##### 4.4.1.1 Sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico molecular

###### a) PCR universal 16S y 18S

Para el cálculo de los parámetros estadísticos de la PCR de amplio espectro seguida de secuenciación se valoraron conjuntamente las técnicas de PCR universal 16S y 18S en los distintos subgrupos de estudio. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 14. Se obtuvo una sensibilidad de 80,8% (IC 95%: 67-89,9), una especificidad de 98,2% (IC 95%: 89-99,9), un valor predictivo positivo de 97,7% (IC 95%: 89-99,9) y un valor predictivo negativo de 84,4% (IC 95%: 72,7-91,9). La eficiencia diagnóstica de la técnica fue de un 89,7%.

Tabla 14. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR universal (16S y 18S).

	PCR universal positiva	PCR universal negativa	
El definitiva	42	10	<b>Sensibilidad 80,8%</b>
El descartada	1	54	
Total	43	64	<b>Especificidad 98,2%</b>
	<b>VPP 97,7%</b>	<b>VPN 84,4%</b>	

## b) PCR universal 16S

La sensibilidad de la técnica se calculó teniendo en cuenta los 50 pacientes con EI bacteriana, uno de ellos con EI mixta (bacteriana y fúngica), asumiendo que las EI no filiadas serían bacterianas. Se obtuvo una sensibilidad de 80% (IC 95%: 65,9-89,5), una especificidad de 94,8% (IC 95%: 84,7-98,7), un valor predictivo positivo de 93% (IC 95%: 79,9-98,2) y un valor predictivo negativo de 84,6% (IC 95%: 73,1-92), (Tabla 15). La eficiencia diagnóstica de la técnica fue de un 88%.

Tabla 15. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR universal 16S.

	PCR 16S positiva	PCR 16S negativa	
El bacteriana	40	10	<b>Sensibilidad 80%</b>
El bacteriana descartada	3	55	<b>Especificidad 94,8%</b>
Total	43	65	
	<b>VPP 93%</b>	<b>VPN 84,6%</b>	

## 4.4.1.2 Sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico clásico

Para el cálculo de estos parámetros se consideraron globalmente los resultados del hemocultivo, el cultivo de tejido valvular y la serología. Se obtuvo una sensibilidad de 92,3% (IC 95%: 80,6-97,5), una especificidad de 87,3% (IC 95%: 74,9-94,3), un valor predictivo positivo de 87,3% (IC 95%: 74,9-94,3) y un valor predictivo negativo 92,3% (IC 95%: 80,6-97,5), (Tabla 16). La eficiencia diagnóstica de la técnica fue de un 89,7%.

Tabla 16. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico clásico.

	Diagnóstico microbiológico clásico positivo	Diagnóstico microbiológico clásico negativo	
El definitiva	48	4	<b>Sensibilidad 92,3%</b>
El descartada	7	48	<b>Especificidad 87,3%</b>
Total	55	52	
	<b>VPP 87,3%</b>	<b>VPN 92,3%</b>	

Respecto a los parámetros específicos de las distintas técnicas microbiológicas clásicas, cabe destacar que la sensibilidad del hemocultivo en pacientes con EI definitiva fue de un 86,5% (IC 95%:73,6-94%), mientras que la del cultivo de válvula fue de un 27,1% (IC 95%: 15,7-42,1). El porcentaje de válvulas cuyo aislamiento se consideró contaminación, teniendo en cuenta los pacientes con EI definitivas, las EI descartadas y el grupo control, fue del 10%. Por último, la tinción de Gram, mostró una baja sensibilidad, de 36,6% (IC 95%: 22,6-53,1%), pero presentó un VPP del 100% (IC 95%: 74,7-100%).

#### 4.4.1.3 Sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico clásico y molecular

Para el cálculo de estos parámetros se consideraron globalmente los resultados positivos del hemocultivo, el cultivo de tejido valvular, la serología, PCR universal seguida de secuenciación y PCR específicas. Las técnicas moleculares negativas permitieron catalogar como contaminaciones los cultivos de tejido valvular en los que se obtuvo un aislamiento en pacientes con EI descartada (pacientes nº68 y nº69) y en 4 pacientes del grupo control.

Se obtuvo una sensibilidad de 96,2% (IC 95%: 85,7-99,3), una especificidad de 98,2% (IC 95%: 89-99,9), un valor predictivo positivo de 98% (IC 95%: 88,2-99,9) y un valor predictivo negativo de 96,4% (IC 95%: 86,6-99,3) (Tabla 17). La eficiencia diagnóstica de la técnica fue de un 97,2%.

Tabla 17. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico clásico y molecular.

	Diagnóstico microbiológico clásico y molecular positivo	Diagnóstico microbiológico clásico y molecular negativo	
El definitiva	50	2	<b>Sensibilidad 96,2%</b> <b>Especificidad 98,2%</b>
El descartada	1	54	
Total	51	56	
	<b>VPP 98%</b>	<b>VPN 96,4%</b>	

La Tabla 18 recoge los parámetros estadísticos calculados con los datos de la técnica de PCR universal, con el diagnóstico microbiológico clásico y combinando todas las técnicas microbiológicas.

Tabla 18. Parámetros estadísticos del diagnóstico microbiológico clásico y molecular.

	PCR universal	Diagnóstico microbiológico clásico	Diagnóstico microbiológico clásico y molecular
Sensibilidad (%)	80,8	92,3	96,2
Especificidad (%)	98,2	87,3	98,2
Valor Predictivo Positivo (%)	97,7	87,3	98,0
Valor Predictivo Negativo (%)	84,4	92,3	96,4
Eficiencia (%)	89,7	89,7	97,2

#### 4.4.2 Concordancia de las técnicas microbiológicas y el diagnóstico de EI

Se determinó el coeficiente kappa para calcular la concordancia entre el diagnóstico según los criterios de Duke modificados y las diferentes técnicas microbiológicas. No se tuvieron en cuenta los dos pacientes con EI descartada que presentaron antecedentes de EI por *Streptococcus* spp. en los que en la PCR universal se detectó este microorganismo (pacientes nº56 y nº60).

##### 4.4.2.1 Coeficiente kappa del diagnóstico microbiológico molecular

Al calcular la concordancia entre el diagnóstico de EI según los criterios de Duke modificados y el resultado de la PCR universal seguida de secuenciación se obtuvo un coeficiente kappa de 0,79 (concordancia de 89,8%), que está establecido como “concordancia considerable”.

##### 4.4.2.2 Coeficiente kappa del diagnóstico microbiológico clásico y molecular

En este caso, para el cálculo del coeficiente kappa se tuvo en cuenta el resultado del hemocultivo, el cultivo de tejido valvular y la serología además del resultado de

la PCR de amplio espectro y la PCR específica. Se obtuvo un coeficiente kappa de 0,94 (concordancia de 97,2%), establecido como “concordancia casi perfecta”.

#### 4.4.3 Análisis comparativo

La sensibilidad de la PCR universal (80,8%) y del hemocultivo (86,5%) fueron significativamente superiores a la sensibilidad del cultivo valvular (27,1%), con un valor de  $p < 0,0001$ .

Respecto a la duración del tratamiento antibiótico en pacientes con EI definitiva y la positividad de la PCR universal, no se han detectado diferencias significativas (Tabla 19). Tampoco se ha detectado una mayor sensibilidad de la técnica de PCR en el caso de que se remita más de una muestra al laboratorio (Tabla 20).

Tabla 19. Resultado positivo de la PCR universal según la duración del tratamiento antibiótico.

	Tratamiento antibiótico más de 5 días	Tratamiento antibiótico 24 horas	Valor p
%PCR universal positiva	80	82	>0.05

Tabla 20. Resultado positivo de la PCR universal según el análisis de una o más muestras por paciente.

	Análisis de una muestra por paciente	Análisis de dos o más muestras por paciente	Valor p
%PCR universal positiva	82,8	78,3	>0.05

## 5 DISCUSIÓN

La EI continúa siendo una enfermedad de elevada tasa de mortalidad y difícil diagnóstico a pesar de los avances tecnológicos, y sigue constituyendo un reto tanto diagnóstico como terapéutico en la actualidad.

El presente trabajo recoge la experiencia inicial del Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe en la implementación de una herramienta de diagnóstico microbiológico molecular: la PCR universal seguida de secuenciación realizada sobre muestra directa de tejido valvular. Con esta técnica se pretende mejorar el diagnóstico etiológico de la EI, permitiendo el tratamiento antibiótico más dirigido de esta complicada infección. Para su validación se han analizado las muestras de tejido y prótesis valvulares procedentes de pacientes con sospecha o diagnóstico de EI y se han comparado los resultados obtenidos en un grupo control de pacientes sin sospecha de EI intervenidos quirúrgicamente por patología valvular. Asimismo, se han comparado los resultados de la PCR universal con aquellos obtenidos por métodos microbiológicos clásicos, con el objeto de determinar el valor diagnóstico añadido por esta técnica. Por último, se ha estudiado la concordancia de los resultados obtenidos por métodos microbiológicos moleculares, microbiológicos clásicos y con el estudio anatomopatológico. El estudio de la relación de las diferentes áreas del laboratorio implicadas en el diagnóstico de la EI permite realizar una valoración global de la situación y detectar puntos de mejora para continuar optimizando el diagnóstico de esta compleja infección.

En este apartado se analizan y discuten por separado los resultados obtenidos en los pacientes del grupo de estudio diagnosticados de EI definitiva, EI posible y EI descartada.

## 5.1 Pacientes con Endocarditis Infecciosa definitiva

### 5.1.1 Edad y sexo

La media de edad de los pacientes diagnosticados de EI definitiva fue de 62,1 (48,7-75,5) años. Este dato coincide con lo descrito en la literatura, que señala una mayor incidencia de EI en la población añosa, sobre todo en países desarrollados<sup>6,9</sup>. En el estudio EURO-ENDO<sup>14</sup> la edad media de los pacientes de los países europeos fue de 61 ±17,4 años. En el estudio ID-IRI, que no diferencia entre países europeos y no europeos, la media de edad fue similar, 59,5 años (16-96)<sup>15</sup>. En España, en la cohorte GAMES, se describe una media de edad de 69 años (rango intercuartílico 55-77)<sup>11</sup>.

Respecto la distribución por sexo, en nuestra serie, la endocarditis afectó con mayor frecuencia a hombres que a mujeres (ratio 2:1), lo que también concuerda con lo descrito en la bibliografía en trabajos sobre EI realizados en diferentes países<sup>6,9,15,109</sup>.

En otros estudios que únicamente recogen pacientes intervenidos quirúrgicamente, los datos de edad y la distribución por sexo son similares. En el estudio de Le Guern, la edad media de los pacientes fue de 61 años y en el 73% de los casos afectaba a hombres<sup>110</sup>. También, en la serie prospectiva de Mularoni *et al.* publicada recientemente, que recoge pacientes desde 2012 a 2021, la media de edad fue de 60 años (rango intercuartílico 25-85). En este caso, se describe un porcentaje de pacientes varones del 73,7%<sup>111</sup>. Son menos los estudios que reflejan edades más bajas, como el de Lamas *et al.* realizado en Brasil en el que la edad media fue de 45 ±16 años<sup>21</sup>.

## 5.1.2 Tipo de muestra

Las EI definitivas en nuestro estudio afectaron a la válvula aórtica en el 46% de los casos, lo que coincide con otros estudios similares que incluyen sólo pacientes sometidos a cirugía, como el estudio de Miller *et al.*, en el que el porcentaje de pacientes con afectación de la válvula aórtica fue del 40%<sup>79</sup>, o del 42% en el caso de la serie de Lamas *et al.*<sup>21</sup>, o incluso más elevado en la serie de 177 pacientes de Mularoni *et al.*, en la que el 56,9% de los pacientes presentaron afectación de la válvula aórtica<sup>111</sup>. En otros estudios como el de Le Guern *et al.* en Francia el porcentaje de válvulas aórticas y mitrales fue el mismo (39%)<sup>110</sup>.

Respecto al tipo de válvula, en el presente estudio, en el 63% de los pacientes estaba afectada la válvula nativa y en el 29% la válvula protésica. También se incluye alguna infección mixta o sobre dispositivo de estimulación intracardiaca de forma aislada. Según la literatura, en los últimos años ha ido aumentando el porcentaje de EI sobre válvula protésica, sobre todo en los países industrializados<sup>8</sup>. El estudio EURO-ENDO presenta 56,5% de afectación en válvula nativa, 30,1% sobre prótesis y 9,9% sobre dispositivos, y señala que no se objetivaron diferencias entre países europeos y no europeos en este sentido<sup>14</sup>. Por otro lado, en el estudio ID-IRI de 2019 el porcentaje de afectación de la válvula nativa es superior, 72,8%<sup>15</sup>. En la revisión de Liesman *et al.* de 2017, se señala que un tercio de los casos de EI se describe sobre prótesis o dispositivos implantables<sup>49</sup>.

Nuestros datos también concuerdan con los publicados por el grupo español GAMES<sup>11</sup>, que incluye 1804 pacientes desde 2008 hasta 2012, en los que se describe afectación de la válvula nativa en un 62,7% de los casos. Por contra, en la

serie madrileña publicada por Navas *et al.*<sup>8</sup>, en los últimos años de estudio (2011-2016), el porcentaje de afectación sobre válvula nativa y protésica fueron similares (44,2% y 45,3% respectivamente).

En cuanto a publicaciones recientes que solo incluyen pacientes intervenidos, el porcentaje de EI sobre válvula protésica es similar al nuestro, 33.8% en el estudio canadiense de Miller *et al.*<sup>79</sup>, 30,1% en el alemán de Maneg *et al.*<sup>112</sup>, 26% en el brasileño de Lamas *et al.*<sup>21</sup>, o superior, como el estudio estadounidense de Shrestha *et al.* que presentan un 54% de EI sobre prótesis valvulares<sup>113</sup>. En cambio, en un estudio coreano de 2017, sólo se describe un 10% de afectación de válvulas protésicas<sup>114</sup>. Todo ello depende de las características de cada centro hospitalario y puede repercutir en la epidemiología de las series de EI.

### 5.1.3 PCR universal y secuenciación en pacientes con EI

#### 5.1.3.1 Sensibilidad y especificidad de la PCR universal

Para valorar la eficiencia global del diagnóstico molecular, se analizaron conjuntamente los resultados obtenidos mediante la PCR 16S y 18S, cubriendo así el máximo espectro posible de agentes causales de la infección.

Se obtuvieron buenos resultados de sensibilidad [80.8% (IC 95%: 67-89,9)], especificidad [98,2% (IC 95%: 89-99,9)], valor predictivo positivo [97,7% (IC 95%: 86,2-99,8)] y valor predictivo negativo 84,4% [(IC 95%: 72,7-91,9)]. La eficiencia diagnóstica de la técnica, también fue buena, 89,7%. En general, estos resultados son similares a publicados en la literatura, aunque hay estudios que presentan mejores parámetros que los descritos en nuestra serie, como el estudio

prospectivo de Mularoni *et al.*, en el que se describe una sensibilidad del 88% (IC 95%: 81-93), especificidad del 100% (IC 95%: 93-100%), VPP del 100% (IC 95%: 97–100%) y VPN del 75% (IC 95%: 64–85%)<sup>111</sup>, o el trabajo del grupo de Marín *et al.*, que obtuvo una sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del 96%, 95,3%, 98,4% y 88,5%, respectivamente<sup>55</sup>. Cabe señalar que el tamaño muestral de nuestra serie es bajo y cambios en uno o dos casos presentan una repercusión importante en los parámetros estadísticos.

Otros estudios anteriores describen una sensibilidad menor que en nuestro trabajo, como Breitkopt *et al.*, que recogen una sensibilidad del 41,2% en 51 pacientes con EI<sup>76</sup>, o Greub *et al.*<sup>77</sup> que muestra una sensibilidad del 61% en 105 pacientes. Sin embargo, en ambas series la especificidad de la técnica fue del 100%, ya que no describieron falsos positivos.

### 5.1.3.2 PCR 16S

En el presente trabajo, se calcularon los parámetros estadísticos específicos de la técnica de PCR 16S con objeto de comparar nuestros resultados con aquellas publicaciones que únicamente recogen datos de esta técnica. La sensibilidad de la técnica de PCR 16S fue del 80% (IC 95%: 65,9-89,5) y la especificidad 94,8% (IC 95%: 84,7-98,6).

Los datos de sensibilidad son similares a los obtenidos teniendo en cuenta ambas técnicas, 16S y 18S (80% vs. 80,8%). La especificidad de la técnica de la PCR 16S sí que disminuye respecto a la global (94,8 vs. 98,2) ya que pone de manifiesto los dos resultados falsos positivos de la técnica de la PCR 16S que no quedaban reflejados en los cálculos estadísticos globales y que se comentan en el siguiente apartado.

Algunos estudios que únicamente describen la técnica de la PCR 16S, revelan unos parámetros de sensibilidad inferiores a los nuestros, como Maneg *et al.*<sup>112</sup> o Le Guern, que describe una sensibilidad de la técnica de PCR 16S del 72,5%<sup>110</sup>. Otros trabajos obtienen mejores resultados: en el estudio de Peeters *et al.*, que incluye 120 pacientes con EI definitiva, la sensibilidad es del 87% (IC 95%: 80-93)<sup>115</sup>, superada por el grupo de Miller *et al.*, cuya sensibilidad es del 92% (IC 95%:84,6-96,5)<sup>79</sup> en una serie muy similar a la nuestra, con 50 pacientes diagnosticados de EI definitiva. Por el contrario, en este último estudio la especificidad descrita fue del 77,8% (IC 95%: 57,4-90,4), menor que la obtenida en el presente trabajo.

### 5.1.3.3 Falsos positivos de la PCR 16S en pacientes con EI fúngica

En el grupo de estudio hubo dos casos de pacientes con EI fúngica en los que la PCR 16S también resultó positiva: se detectó *Streptococcus* spp. en un paciente con EI por *Candida parapsilosis* (paciente nº3) y *Massilia suwonensis* en un paciente con EI por *Fusarium solani* (paciente nº46).

En ambos pacientes se aisló el hongo en el cultivo de tejido valvular (en el caso de la *Candida parapsilosis* también se aisló en el hemocultivo). Sin embargo, las bacterias detectadas por PCR, *Streptococcus* spp. y *Massilia suwonensis*, no crecieron en ningún cultivo y se consideraron falsos positivos de la técnica de PCR 16S.

Los *Streptococcus* spp., forma parte de la microbiota habitual del ser humano (orofaríngea, dental, urogenital y gastrointestinal) y es factible que la muestra se contamine durante la manipulación desde la resección quirúrgica hasta su procesamiento en el laboratorio. Por otro lado, y como se ha comentado, se ha descrito que el ADN bacteriano puede persistir detectable en tejidos durante

periodos prolongados, incluso años. Se podría plantear la posibilidad de una EI pasada no conocida. En el estudio de Le Guern, también se describe un caso en el que se detectó ADN de *Streptococcus mitis/oralis* en uno de los 10 pacientes sin sospecha de EI que formaba parte del grupo control<sup>110</sup>.

En nuestro caso, el paciente nº3, que presentaba la EI por *Candida parapsilosis*, recibió tratamiento antibiótico y antifúngico. A pesar de ello fue *exitus letalis* a los dos meses de la intervención.

El otro microorganismo responsable de contaminación fue *Massilia suwonensis*. El género *Massilia* spp. está formado por bacilos gramnegativos aerobios, catalasa positiva y oxidasa variable. Se ha demostrado su presencia en glaciares, suelo, agua de bebida o en el aire. También se ha descrito, de forma puntual, como agente etiológico de infecciones humanas, aunque no como causante de EI. Su detección por técnicas moleculares podría poner de manifiesto una posible contaminación en el transcurso del procesamiento de la muestra. En las publicaciones revisadas no se ha descrito ninguna contaminación de la PCR universal por bacilos gramnegativos no fermentadores.

En el caso del paciente nº46, con EI por *Fusarium solani*, también recibió tratamiento antibiótico además del antifúngico. Fue *exitus letalis* a los 2 meses de la intervención.

Como se ha comentado en la introducción, es importante recordar las buenas prácticas de laboratorio para minimizar las posibles contaminaciones en el momento de la extracción de ácidos nucleicos, la reconstitución de los reactivos de amplificación o la preparación de la placa de reacción de PCR. En nuestro

laboratorio se respetó en todo momento el flujo de trabajo, con áreas de trabajo separadas y material de laboratorio específico para los procesos de extracción y de amplificación. También se trabajó en cabina de bioseguridad de tipo II para el pretratamiento de la muestra y la preparación de reactivos y placas de reacción.

### 5.1.3.4 Casos en los que amplifica el gen 16S pero no se consigue identificar el amplicón por secuenciación

Una dificultad en el desarrollo de esta técnica de biología molecular es la existencia de casos en los que se amplifica el gen 16S pero no se consigue identificar el amplicón por secuenciación. En el presente trabajo, recogemos 7 muestras de 4 pacientes en las que sucedió esta eventualidad. Las principales causas se podrían explicar por:

1. Una carga bacteriana escasa: en este caso la cantidad de ADN del *amplicón* es demasiado baja y, aunque se pueda apreciar una amplificación tenue en el gel de agarosa, la secuenciación no es exitosa. La carga bacteriana escasa puede ser debida a un error en el muestreo, o una contaminación de la muestra en el momento de la toma o en el laboratorio.
2. La presencia de más de un microorganismo en la muestra: se obtendría entonces una secuencia híbrida de ADN de los dos microorganismos que no resultaría en una identificación efectiva en el proceso de secuenciación. Se puede sospechar si la amplificación en el gel de agarosa es prominente pero el resultado de la secuenciación es negativo.

En la literatura, la mayoría de artículos no hacen alusión a este problema. Peeters *et al.*, sí que adjunta una tabla con el detalle de los resultados de la secuenciación y

registra un caso en el que hubo amplificación del gen 16S pero no se consiguió secuenciar<sup>115</sup>. En el trabajo Maneg *et al.*, recogen 7 casos de 40 en los que la PCR 16S fue positiva pero no consiguieron obtener una secuencia que identificara el microorganismo<sup>112</sup>. Aducen que en 3 casos fue debido a una mezcla de microorganismos y en 4 casos lo achacaron a la baja cantidad de ADN bacteriano, aunque no explican cómo llegan a esta conclusión en todos los casos.

En el presente trabajo, la técnica de PCR es a punto final y se emplea el gel de agarosa para la detección del amplicón, cuya interpretación es más subjetiva. Sin embargo, este problema se puede subsanar empleando técnicas de PCR a tiempo real, en las que se determina el ciclo umbral (CT, del inglés *Cycle Threshold*). Aunque el valor del CT no está estandarizado y varía con el tipo de muestra y la técnica utilizada, sí que permite hacer una aproximación de la cantidad inicial de material genético del microorganismo en la muestra, de modo que a menor CT mayor cantidad de ADN inicial.

Por ejemplo, Marín *et al.*, definen el punto de corte en un CT de 26 para valorar si la técnica de amplificación es positiva. Describen, en su grupo control, 6 muestras en las que existió amplificación entre los ciclos 28 y 31 pero no se consiguió una identificación por secuenciación. En los cultivos de estas muestras supuestamente estériles también se detectó crecimiento bacteriano y se consideró contaminación<sup>55</sup>. Edwards *et al.* señalan que todas las PCR que amplificaron con un CT menor de 25 se identificaron después por secuenciación<sup>116</sup>.

### 5.1.3.5 PCR 18S

No todos los artículos publicados recogen datos de esta técnica ya que, como se ha comentado, en la mayoría de trabajos sólo se estudia la PCR 16S.

La técnica de PCR 18S, en nuestro caso, corroboró el resultado del hemocultivo en dos casos de EI por *Candida* spp. y confirmó el resultado del cultivo de *Fusarium solani* en un paciente con hemocultivos negativos.

En el resto de pacientes con EI definitiva en los que se realizó la PCR 18S, y en todos los pacientes del grupo control, esta técnica resultó negativa y no se detectaron falsos positivos. Por el contrario, en otros estudios sí que se han descrito falsos positivos; Shrestha *et al.* describen que, de las 117 muestras analizadas por secuenciación fúngica, 15 resultaron positivas, de las cuales 8 (53%) se consideraron contaminación<sup>113</sup>. Señalan que la PCR 18S no aportó un diagnóstico etiológico que no se hubiera conseguido por cultivo y concluyen que no se debe realizar de forma general. En otro estudio en el que se analizan 65 muestras de diferentes localizaciones, también se concluye que esta técnica no aporta ninguna etiología no hallada en los cultivos tradicionales y se describen 3 casos de falsos positivos<sup>117</sup>.

En nuestro caso, no se ha descrito ningún falso positivo por esta técnica y pensamos que es beneficioso para el diagnóstico realizar la PCR 18S a pesar de que también se obtenga el aislamiento en el cultivo valvular, ya que se trata de microorganismos que raramente producen EI y llegar al mismo diagnóstico etiológico por diferentes técnicas permite afianzar el diagnóstico y hacer una validación continua de la sensibilidad y especificidad de la técnica.

### 5.1.3.6 Número de muestras procesadas para PCR universal

De los 52 pacientes con EI definitiva, en 29 pacientes se remitió una única muestra al laboratorio y la PCR universal fue positiva en 24 (82,8%). En 18 pacientes se procesaron 2 muestras y la PCR universal resultó positiva al menos en una de las muestras en 14 (77.8%). De 4 pacientes se remitieron 3 muestras y en 3 de ellos (75%) se obtuvo un resultado positivo de la PCR universal en alguna muestra. Como reflejan estos datos, no se encontraron diferencias significativas de los resultados positivos de PCR universal entre los pacientes en los que se procesó una sola muestra frente a los que se procesaron 2 o más muestras. Sin embargo, 9 pacientes se beneficiaron del envío de más de una muestra al laboratorio, ya que alguna resultó negativa o se amplificó el gen 16S pero la secuenciación no fue exitosa. En nuestro centro, no está establecido un protocolo que indique el número de muestras que es necesario enviar al laboratorio y se remiten las que el cirujano considera oportunas en el momento de la cirugía. En cualquier caso, es muy importante identificar en el quirófano de forma clara la procedencia y el tipo de muestra para su correcto procesamiento en el laboratorio. La mayoría de artículos no mencionan la necesidad de recoger más de una muestra ni detallan cuántas muestras se procesaron de cada paciente o si hubo discordancias. En algunos artículos como el de Marín *et al.*, sí que se especifica y explican que en aquellos pacientes en los que se procesó más de una muestra obtuvieron los mismos resultados de la PCR universal<sup>55</sup>. Shrestha *et al.* apuntan que el número exacto de especímenes que debe ser procesado todavía está en duda y que se debe estudiar cada caso teniendo en cuenta tanto el coste de la prueba como la necesidad de

hacer un diagnóstico<sup>113</sup>. Según nuestra experiencia, en la que en 9 pacientes se pudo realizar el diagnóstico molecular gracias a que se procesó más de un espécimen, el envío de muestras de diferentes localizaciones sí que es beneficioso y se podría establecer de forma rutinaria en aquellos pacientes en los que se desconozca el agente causal en el momento de la cirugía.

### 5.1.3.7 Resultados negativos de la técnica de PCR universal

En nuestra serie se obtuvo un resultado negativo de la técnica de PCR universal en 10 de los 52 pacientes con EI definitiva, el 19,2% de los casos.

En otros trabajos se recogen datos más bajos, como el de Peeters *et al.*, que obtuvieron resultados negativos de la PCR 16S en 14 pacientes de 120 (12%)<sup>115</sup> o el de Mularoni *et al.*, en el que la PCR universal fue negativa en 17 de 137 pacientes (12,4%)<sup>111</sup>. Reiterar que en nuestro estudio el número de pacientes es bajo, por lo que pequeñas variaciones en los resultados se traducen en notables variaciones en los porcentajes.

Entre las posibles causas de falsos negativos de la técnica de PCR universal se encuentra:

1. Baja carga del microorganismo: presencia de ADN por debajo del límite de detección de la técnica. Hay que tener en cuenta que, en general, no existe un enriquecimiento de la muestra previo al procesamiento de la PCR, como puede ocurrir en el caso del cultivo bacteriológico. Sin embargo, Mularoni *et al.*, sí que describen un enriquecimiento de la muestra en caldo de thioglicolato durante 16-24 horas<sup>111</sup>. Se podría pensar en una posible fuente de contaminación, pero

los datos que obtienen tanto de sensibilidad (88%) como de especificidad (100%) son mejores que los descritos en el presente trabajo.

2. Muestreo erróneo: los microorganismos no están homogéneamente distribuidos en el tejido y los resultados pueden reflejar ensayos moleculares procesados en tejidos estériles o con baja carga de microorganismos. En una carta al editor de 2015, se comunica un caso de EI por *Bartonella* spp. donde se compara el valor del CT obtenido en diferentes muestras procesadas en el mismo laboratorio. En una de ellas se detectó el gen 16S con un valor de CT de 14 y en otra con un valor de CT de 24<sup>118</sup>. Esto nos permite hacer una aproximación de la carga bacteriana desigual que puede existir en distintos tejidos de un mismo paciente. Se puede suponer que en aquellas EI causadas por microorganismos más agresivos o que producen alteraciones características del endocardio es más fácil seleccionar el tejido afectado y en otros microorganismos que causan infecciones más larvadas el muestreo es más complejo. Se podría proponer la recolección de más de una muestra en este último caso.
3. Otra causa de falsos negativos es la presencia de inhibidores de la reacción de PCR o un posible fallo en el proceso de extracción del ADN. Sin embargo, esta opción en principio queda descartada en el presente trabajo ya que en todos los pacientes se amplificó el gen de la  $\beta$ -globina humana, que asegura el correcto procedimiento de extracción de la muestra y del proceso de amplificación.

4. Tratamiento antibiótico. El tratamiento antibiótico prolongado se ha relacionado con un mayor porcentaje de resultados negativos de la PCR universal en algunos trabajos. Rovey *et al.* observaron que el ADN bacteriano se amplificó con mayor frecuencia en los pacientes que estaban recibiendo tratamiento antibiótico en el momento de la cirugía (76 de 126; 60%) que en los pacientes que en ese momento ya habían completado el tratamiento antibiótico (11 de 30; 37%;  $p < 0,02$ )<sup>119</sup>. Peeters *et al.* sin embargo, no observaron que el tratamiento antimicrobiano preoperatorio eficaz tuviera efectos negativos en el rendimiento de la PCR 16S<sup>115</sup>.

En el presente trabajo todos los pacientes con EI definitiva estaban con tratamiento antibiótico en el momento de la intervención y no se ha encontrado correlación entre la duración de dicho tratamiento y el resultado de la PCR.

### 5.1.4 PCR específicas

De los tres pacientes (nº49, nº50 y nº51) en los que la PCR universal fue negativa y se realizaron PCR específicas de *Tropheryma whipplei*, *Coxiella burnetii* o *Bartonella* spp., sólo resultó positiva en el caso del paciente nº49, en el que se detectó *Tropheryma whipplei* por esta técnica.

Como se ha comentado en la introducción, la PCR dirigida a microorganismos específicos es más sensible que la PCR universal para el diagnóstico de EI<sup>120,121</sup>. En la serie recogida por Fournier *et al.*, que estudia 177 pacientes con EI definitiva y hemocultivo negativo, el diagnóstico de *Tropheryma whipplei* se realizó por PCR específica o por inmunohistoquímica, siendo la PCR universal negativa. Describe 3

casos: en un caso la bacteria se detectó en sangre y en válvula, en otro sólo se detectó en sangre, ya que el paciente no fue intervenido, y en el último únicamente se detectó en el tejido valvular<sup>84</sup>. Sin embargo, en otras series como la de Marín o la de Shrestha *et al.* sí que se detectó este microorganismo con la PCR universal<sup>55,113</sup>.

Respecto al paciente nº51, diagnosticado por serología de EI por *Coxiella burnetii*, tanto la PCR universal como la PCR específica de *Coxiella burnetii*, resultaron negativas. Algunas publicaciones, como la de Peeters *et al.* sí que recogen la detección de 2 casos de *Coxiella burnetii* con la técnica de PCR 16S<sup>115</sup>. Al contrario, en la serie de Fournier *et al.*, se detectó por medio de la PCR específica. En este trabajo realizado en Marsella, área endémica de *Coxiella burnetii*, se recogen 23 casos de EI por este microorganismo diagnosticados por serología en los cuales la PCR universal en sangre fue negativa. Fueron intervenidos 7 de estos 23 pacientes y en 3 de ellos se realizaron técnicas de biología molecular sobre la válvula. La PCR 16S fue negativa mientras que la PCR específica de *Coxiella burnetii* resultó positiva en los 3 casos. Cabe señalar que la PCR específica también se realizó en sangre en los 23 pacientes y fue positiva en un paciente no sometido a cirugía y en otro en el que en la válvula también se detectó<sup>84</sup>. Mularoni *et al.* también describen dos casos de *Coxiella burnetii* en los que la PCR universal fue negativa y se diagnosticaron por serología y PCR específica<sup>111</sup>.

En nuestro paciente, en el que tanto la PCR universal como la PCR específica resultaron negativas, se repitió el procesamiento de la muestra (conservada a -20°C) desde la extracción, y se realizó la PCR específica por 3 técnicas diferentes,

pero el resultado fue negativo en todas ellas. Cabe señalar que la muestra remitida al laboratorio fue la prótesis, y se procesó por separado el tejido adherido y el líquido obtenido tras la sonicación de la prótesis. En este caso, cabría plantearse si la remisión de alguna muestra más de tejido periprotésico habría posibilitado el diagnóstico molecular.

El grupo de Fournier *et al.*, en su trabajo prospectivo en pacientes con hemocultivo negativo, no obtienen una diferencia significativa de la sensibilidad de la PCR específica frente a la PCR universal. Sin embargo, sí que comprobaron que la PCR específica aumentó el rendimiento diagnóstico en un 24,3% de su serie. En consecuencia, proponen un esquema de diagnóstico en el que se utilizan las técnicas de PCR específicas en primer lugar, seguido de otras técnicas cuando la prueba es negativa<sup>84</sup>.

### 5.1.5 Diagnóstico microbiológico clásico y molecular en pacientes con EI

#### 5.1.5.1 Agente causal

La distribución del agente causal detectado por PCR universal comparado con el determinado empleando todas las técnicas microbiológicas fue similar. La etiología más frecuente en nuestra serie fue *Staphylococcus* spp. (34,6% vs. 46%), con predominio de *Staphylococcus aureus* (23,1% vs. 31%), *Streptococcus* spp. (21,2% vs. 29%), seguida de *Enterococcus faecalis* (7%), hongos (6%) y otros microorganismos (3,8% vs. 6%). En 10 de 52 pacientes la PCR fue negativa (19,2%), mientras que en 2 de 52 (3,8%), no se consiguió filiar el agente causal por ninguna técnica microbiológica.

Esta distribución coincide con numerosas publicaciones tanto nacionales como internacionales en países industrializados, que señalan que los géneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. constituyen el 80% de las causas EI<sup>8,11</sup>. En la serie del grupo GAMES se presenta una distribución similar de los principales grupos: *Staphylococcus* spp. 40,3 %, *Streptococcus* spp. 24,4% y *Enterococcus* spp. 12,7%<sup>11</sup>.

Como se comentó en la introducción, en las últimas décadas *Streptococcus* spp. ha sido sustituido por *Staphylococcus* spp. como principal agente causal de la EI en los países industrializados, con un especial protagonismo de *Staphylococcus aureus*<sup>7,8</sup>. Esta tendencia queda reflejada en nuestra serie y en otras como la de Shrestha *et al.*, que presentan un porcentaje de 34,5% de *Staphylococcus* spp. y 24,7% de *Streptococcus* spp<sup>13</sup>.

Sin embargo, otros estudios recientes de pacientes intervenidos quirúrgicamente describen una distribución diferente de los agentes causales de EI. En el estudio italiano de Mularoni, que recoge 137 casos, continúa prevaleciendo la EI por *Streptococcus* spp. frente a *Staphylococcus* spp., (37,9 vs. 27,1%)<sup>11</sup>. Lo mismo sucede en el trabajo coreano de Min Sun *et al.* (49,2 vs. 20%), que recoge 65 casos<sup>14</sup>, o en el estudio de Brasil de Lamas *et al.*<sup>21</sup>. Este último compara retrospectivamente pacientes con hemocultivo positivo y negativo, observando que *Streptococci* del grupo *viridans* predominaron en ambos grupos. Señalan que cerca de un tercio de las lesiones cardíacas predisponentes en pacientes con EI sometidos a cirugía se debían a fiebre reumática, todavía bastante prevalente en Brasil, y que una parte importante de la población presenta una deficiente salud

dental<sup>21</sup>. Por último, en el estudio de Peeters realizado en Bélgica y que recoge 120 pacientes intervenidos, la proporción de ambas etiologías es similar (33% vs. 34%)<sup>115</sup>.

Respecto a la proporción de *Enterococcus* spp., nuestro trabajo recoge un porcentaje de EI por este microorganismo del 7%, inferior al mostrado en estudios poblacionales. En el registro EURO-ENDO y el estudio de ID-IRI, los enterococos representan un 15,8% y un 16,1% de las EI totales respectivamente. La proporción de *Enterococcus* spp. también es más elevada en la serie GAMES de 2015, donde representa un 12,7% del total de las EI.

Por último, cabe destacar el mayor porcentaje de etiología fúngica de nuestra serie (6%), comparada con lo descrito en la literatura, en la que las EI fúngicas suelen representar aproximadamente el 2% de las totales. En el estudio GAMES describen un 2,4% de EI por hongos<sup>11</sup> y en de Lamas *et al.* detectaron un 5% de EI por *Candida* spp. en una serie de 131 pacientes<sup>21</sup>. Respecto a otros estudios realizados únicamente en pacientes intervenidos, Mularioni *et al.* sólo presentaron 3 casos de EI por *Candida* spp. de 137 pacientes (2,2%)<sup>111</sup> y Shrestha *et al.* describieron un 2,9% de EI fúngicas en una serie retrospectiva de 174 pacientes<sup>113</sup>.

La mayor proporción de etiología fúngica en nuestra serie podría ser consecuencia del pequeño tamaño muestral. Serían necesarios futuros estudios para comprobar si se mantiene este porcentaje de endocarditis fúngicas en nuestro medio.

### 5.1.5.2 EI no filiadas

En el presente trabajo, el 3,8% de los casos diagnosticados de EI definitiva según los criterios de Duke modificados (2 de los 52 casos), no se consiguieron filiar

empleando el diagnóstico microbiológico clásico y molecular, incluyendo la PCR de amplio espectro y las PCR específicas de *Tropheryma whipplei*, *Coxiella burnetii* y *Bartonella* spp. En estudios semejantes al nuestro, el porcentaje de EI no filiadas es similar; en el grupo de Shrestha *et al.*, en 8 de 174 pacientes con EI intervenidos quirúrgicamente no se filió la infección (4,6%)<sup>113</sup>. Mularoni *et al.* no consiguieron el diagnóstico etiológico en el 2% de los casos (3 de 137)<sup>111</sup>. En el trabajo de Le Guern *et al.*, que comparan la validez de dos cebadores para la técnica de PCR 16S, describen un 3% de EI no filiadas<sup>110</sup>, y Peeters *et al.* no consiguieron filiar la EI en 2 de los 120 pacientes de su estudio (1,7%)<sup>115</sup>. Por último, el grupo de Marín consiguió determinar el agente etiológico de los 35 los pacientes de su serie. Posiblemente, la mayor proporción de EI no filiadas en el presente trabajo sea consecuencia de la menor sensibilidad de nuestra técnica de PCR 16S en comparación con la descrita en las citadas publicaciones influido por el bajo tamaño muestral de nuestra serie.

### 5.1.5.3 Tinción de Gram de tejido valvular

Se observaron microorganismo en el 36,6% de los pacientes con EI en los que se registró la tinción de Gram (15/41). Este porcentaje es ligeramente superior al de otras series como la de Miller o Le Guern, en las que se observan microorganismos en la tinción de Gram en un 26% y 25% de los casos respectivamente<sup>79,110</sup>.

La tinción de Gram destacó por su elevado VPP, 100% (IC 95%: 74,7-100%); todos los pacientes en los que se observaron microorganismos en la tinción de Gram presentaron EI. Además, en todos los casos (15/15), el microorganismo observado coincidió con el agente causal detectado por alguna técnica microbiológica (93,3%

por PCR universal y 93,3% por hemocultivo). En el 81,8% (9/11) de los pacientes en los que sólo se vieron leucocitos en la tinción de Gram se detectó el agente causal por hemocultivo y la PCR universal fue positiva en el 72,7% de ellos. Por último, de los 15 casos en los que no se observaron microorganismos ni leucocitos en la tinción de Gram, se detectó el agente causal por diagnóstico microbiológico en todos los casos: la PCR fue positiva en 12 pacientes (80%), el hemocultivo en 13 (93,3%) y en un caso se identificó por serología.

En nuestra serie, detectamos una mayor sensibilidad de la PCR en aquellos casos en los que se observaron microorganismos en la tinción de Gram frente a los que no, independientemente de que se observaran leucocitos o no (93,3% vs. 72,7% y 80%). Le Guern *et al.* también observaron esta tendencia. En su trabajo, la técnica de PCR 16S fue positiva en el 100% de los pacientes en los que se observaron bacterias en la tinción de Gram (14/14), y sólo en el 63,4% (26/41) de los que no<sup>110</sup>. Rovero *et al.* también describieron una detección por PCR significativamente superior en las válvulas en las que se observaron bacterias en la tinción de Gram [74 % (43 de 58) vs. 44% (37 de 84) ( $p < 0.001$ )]<sup>86</sup>. Probablemente estos resultados se atribuyan a una mayor carga de microorganismos en aquellas muestras en las que es posible visualizarlos en la tinción de Gram.

### 5.1.5.4 Cultivo valvular

La sensibilidad del cultivo de tejido valvular, teniendo en cuenta los verdaderos positivos en el caso de los pacientes con EI definitiva, fue del 27,1% (IC 95%: 15,7-42,1), con un porcentaje de contaminaciones en pacientes con EI definitiva del 7,7%.

La baja sensibilidad en los cultivos de válvulas y el elevado número de contaminaciones es una constante reflejada en la literatura sobre el tema.

Algunos autores como Mularoni *et al.*<sup>111</sup> describen una sensibilidad más baja que la nuestra (19,7%), si bien el porcentaje de contaminaciones también fue mucho menor; sólo se contaminaron 3 de 137 cultivos (2,2%)<sup>111</sup>. Shrestha *et al.* refiere sensibilidad similar a la nuestra (29,8%) pero un porcentaje ligeramente superior de contaminaciones; 13,5%<sup>113</sup>. Peeters *et al.* también presenta una sensibilidad del cultivo similar a la nuestra 26% (IC 95%:18-34) y no publica datos sobre posibles contaminaciones<sup>115</sup>. Cabe destacar la elevada sensibilidad comparada con el resto de estudios, descrita por Miller *et al.* [46% (IC 95%: 33-59,6)]. Se podría explicar por el tipo de procesamiento de los tejidos en el laboratorio. Según describen en su metodología, Trituran las válvulas en medio de enriquecimiento y, además del cultivo habitual, también inoculan 100µL del sedimento en frascos de hemocultivos. Tras 7 días de incubación realizan un nuevo subcultivo que incuban durante otra semana<sup>79</sup>.

Otro dato que llama la atención es la cantidad de cultivos contaminados que se describe en el trabajo de Marín *et al.*, en el que se consideró el cultivo contaminado en 50/129 muestras del grupo control y 13/48 muestras del grupo de estudio.

En nuestro caso, el cultivo no aportó ningún aislamiento que no se hubiera identificado por PCR universal, lo que coincide con lo descrito en publicaciones similares<sup>55,84,111,113</sup>. La sensibilidad de la PCR fue significativamente superior a la del cultivo, como corroboran otros estudios como el de Peeters *et al.*<sup>115</sup> o el de

Shrestha *et al.* Este último estudio también señala que el cultivo de válvulas presentó de forma significativa más falsos positivos que la PCR universal (33% vs. 3%,  $p < 0,001$ )<sup>113</sup>.

En vista de la baja sensibilidad y especificidad de la técnica de cultivo valvular, algunos autores abogan por priorizar las técnicas moleculares al cultivo, o incluso sustituirlo<sup>55,113</sup>. Sin embargo, esto dejaría sin antibiograma a pacientes en los que el hemocultivo resulta negativo. Mularoni *et al.* evalúan la realización de un antibiograma molecular sobre válvula cardiaca en 17 pacientes con EI y obtienen una buena correlación con el antibiograma clásico. Proponen su uso cuando el agente causal se detecte únicamente por métodos moleculares y el microorganismo en cuestión sea portador potencial de genes de resistencia<sup>111</sup>.

### 5.1.5.5 Hemocultivo

En el presente trabajo, la sensibilidad del hemocultivo en pacientes con EI definitiva fue del 86,5% (IC 95%:73,6-94), con un porcentaje de hemocultivos negativos del 13,5%. Este valor se encuentra en la parte baja del rango descrito en la literatura (del 12% al 45%). Nuestros datos son similares a la de otras series recientes como la de Peeters *et al.*<sup>115</sup> que describe una sensibilidad de esta técnica del 87% (IC 95%: 79-92%), o la de Maneg y Miller *et al.*, que presentan un porcentaje de hemocultivos negativos del 13,4% y del 12% respectivamente<sup>79,112</sup>. En otros estudios el porcentaje de negativos rondaba el 20%<sup>110,113</sup>. Según sugieren Liesman *et al.* en una revisión reciente, una forma de disminuir el porcentaje de hemocultivos negativos sería realizar labor de docencia insistiendo en que se procesen los hemocultivos antes de administrar el tratamiento antibiótico<sup>49</sup>. Por

otro lado, cabe tener presente la epidemiología de la EI en el lugar del estudio; por ejemplo, los pacientes descritos en el trabajo de Fournier *et al.* pertenecen a un hospital de referencia de EI ubicado en un área de Francia endémica en *Coxiella burnetii*, lo que explicaría su elevado porcentaje de hemocultivos negativos (30,8%)<sup>84</sup>. Otros estudios presentan un porcentaje de hemocultivos negativos incluso más elevado, de hasta el 40% en el caso de Lamas *et al.*<sup>21</sup> y del 45% en el caso de Mularoni *et al.*<sup>111</sup>, que los autores atribuyen al tratamiento antibiótico previo.

### 5.1.5.6 Diagnóstico microbiológico en pacientes con hemocultivo negativo

En 7 pacientes de nuestro estudio no se obtuvo un aislamiento en el hemocultivo. En tres de estos pacientes se consiguió identificar el microorganismo responsable de la EI por PCR universal seguida de secuenciación (*Fusarium spp.*, *Haemophilus parainfluenzae* y *Streptococcus gallolyticus*), en otros dos casos se diagnosticó por serología de *Coxiella burnetii* y por PCR específica de *Tropheryma whipplei*. Los dos casos restantes no se consiguieron filiar.

En la siguiente tabla se recogen datos de diferentes trabajos revisados. Se detallan los microorganismos identificados por PCR universal y otras técnicas microbiológicas en pacientes intervenidos con hemocultivo negativo.

Tabla 21. Microorganismos identificados por PCR universal, PCR específica o serología en pacientes con hemocultivo negativo.

Autor	Pacientes sometidos a cirugía con HC negativo	Microorganismos detectados por PCR universal en pacientes con HC negativo	Microorganismos detectados por otras técnicas en pacientes con HC negativo	El no filiadas
Serie propia	7/52 13,5 %	3/7 <i>Str. grupo gallolyticus</i> 1 <i>Haemophilus parainfluenzae</i> 1 <i>Fusarium solani</i> 1	→ Serología <i>Coxiella burnetii</i> 1 → PCR específica <i>Tropheryma whipplei</i> 1	2/52 3,8%
Marín et al. <sup>55</sup>	3/35 8,6%	3/3 <i>Bartonella quintana</i> 1 <i>Tropheryma whipplei</i> 1 <i>Str. grupo gallolyticus</i> 1	-	0/35
Mularoni et al. <sup>111</sup>	62/137 45%	57/137 41,6% <i>Bartonella spp.</i> 1 <i>Streptococcus spp.</i> 27 STACN 12 <i>Staphylococcus aureus</i> 3 <i>Enterococcus spp.</i> 3 BGN no fastidioso 2 <i>Brucella melitensis</i> 1 HACEK 2 <i>Cutibacterium acnes</i> 2 <i>Lactobacillus casei</i> 1 <i>Mycobacterium avium complex</i> 1 <i>Parvimonas micra</i> 1 <i>Rothia dentocariosa</i> 1	→ Serología y PCR específica 2/137 <i>Coxiella burnetii</i> 2	3/137 2,2%
Shrestha et al. <sup>113</sup>	43 /171 25,1% (3 pacientes no tenían HC)	25/174 14.4 % <i>Bartonella henselae</i> 5 <i>Tropheryma whipplei</i> 1 <i>Str. grupo viridans</i> 10 <i>Enterococcus spp.</i> 3 STACN 2 <i>Staphylococcus aureus</i> 1 <i>Mycoplasma hominis</i> 1 <i>Cutibacterium acnes</i> 2	→ Serología 1/174 <i>Bartonella spp.</i> 1  En 12 pacientes no especifican cómo realizan el diagnóstico microbiológico.	8/174 4,6%

Le Guern <i>et al.</i> <sup>110</sup>	7 / 55  12,7%	5 / 7  Sólo PCR 16S	<i>Bartonella quintana</i> 1 <i>Str. grupo gallolyticus</i> 1 <i>Streptococcus</i> spp. 1 STACN 1 <i>Enterococcus</i> spp. 1	-	2/55 3,6%
Fournier <i>et al.</i> <sup>84</sup>	119	52/119  43,7 %	<i>Str. grupo gallolyticus</i> 5 <i>Str. grupo viridans</i> 3 <i>Str. agalactiae</i> 3 STACN 19 <i>Staphylococcus aureus</i> 3 <i>Enterococcus</i> spp. 3 Otros 7 <i>Haemophilus parainfluenzae</i> 1 <i>Cutibacterium acnes</i> 8	→PCR específica 35/119 <i>Coxiella burnetii</i> 3 <i>Bartonella</i> spp. 4 <i>Tropheryma whipplei</i> 2 <i>Str. grupo gallolyticus</i> 7 <i>Str. grupo viridans</i> 3 <i>Staphylococcus aureus</i> 7 <i>Enterococcus</i> spp. 8 <i>Mycoplasma hominis</i> 1	

Abreviaturas: HC = hemocultivo; STACN = *Staphylococcus* spp. coagulasa negativa; *Str.* = *Streptococcus*; BGN = bacilo gramnegativo; HACEK = *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*.

El principal agente causal de EI en pacientes con hemocultivos negativos son los cocos grampositivos, como recogen publicaciones previas<sup>122</sup>, y como queda reflejado en los trabajos revisados recogidos en la Tabla 21. Dependiendo de la serie, los microorganismos intracelulares como *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii* y *Tropheryma whipplei* también tienen un peso importante en pacientes con cultivos negativos. En este sentido, a pesar de que nuestra casuística es baja, sí que coincide con lo descrito en la literatura.

## 5.1.5.7 Valor diagnóstico añadido por la PCR universal

En el presente trabajo, la PCR universal fue la única técnica microbiológica capaz de proporcionar el diagnóstico etiológico de la EI en un caso de 52 (2%). También confirmó el resultado obtenido por medio del cultivo valvular en 2 pacientes con hemocultivo negativo y corroboró el resultado del hemocultivo en un paciente cuyo cultivo valvular estaba contaminado. Por lo tanto, en 4 de 52 pacientes (7,7%) la técnica de PCR universal añadió valor diagnóstico en el caso de EI definitivas.

Estos valores son comparativamente inferiores a los obtenidos en otros estudios.

En el caso de Peeters *et al.*, afirman que el 21% de los pacientes (27/120) se benefició del resultado de la PCR 16S, y que en el 10% de los casos (12/120) representó la única técnica microbiológica positiva<sup>115</sup>. En el trabajo de Shrestha *et al.* no se hubiera llegado al diagnóstico etiológico en el 14,4% de los pacientes (25/174) si no hubiera sido por la secuenciación del gen 16S<sup>113</sup> y en el de Mularoni, esta técnica molecular es la única que reveló el agente causal en un 41,6% de los pacientes (57/137)<sup>111</sup>.

En el presente trabajo, sólo en un paciente la PCR fue la única técnica microbiológica positiva. La razón de nuevo hay que buscarla en la menor sensibilidad de nuestra técnica respecto a la descrita en los trabajos citados. Sin embargo, en las publicaciones de Shrestha y Mularoni *et al.*, esta diferencia tan notable en cuanto al valor diagnóstico añadido, se explica también porque el porcentaje de hemocultivos negativos fue de casi el doble en la serie de Shrestha<sup>113</sup> y de más del triple en la de Mularoni<sup>111</sup>, como se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. Valores de sensibilidad y especificidad de la PCR universal en diferentes estudios revisados.

	<b>Serie propia</b>	<b>Peeters et al.<sup>115</sup></b>	<b>Shrestha et al.<sup>113</sup></b>	<b>Mularoni et al.<sup>111</sup></b>
Pacientes intervenidos con hemocultivo negativo	13,5%	13,3%	25,1%	45%
Sensibilidad de la técnica de PCR universal	80,8%	86,7%	86,2%	88%
Pacientes con PCR universal como única técnica diagnóstica	2%	10%	14,4%	41,6%

#### 5.1.5.8 Potencia diagnóstica de las técnicas microbiológicas

En el presente trabajo se obtuvo un elevado porcentaje de concordancia con el diagnóstico de EI según los criterios de Duke modificados y los resultados obtenidos con las diferentes técnicas microbiológicas, con un coeficiente kappa de 0,94 (concordancia de 97,2%), establecido como “concordancia casi perfecta”.

El diagnóstico microbiológico global (hemocultivo, PCR universal, PCR específica y serología) obtuvo unos elevados valores de sensibilidad de 96,2% (IC 95%: 85,7-99,3) y especificidad de 98,2% (IC 95%: 89-99,9) y una eficiencia diagnóstica del 97,2%.

Los trabajos revisados presentan una sensibilidad diagnóstica similar, destacando la de Mularoni et al, con una sensibilidad global del 98%<sup>111</sup> y la de Marín, que consiguen identificar el agente causal en todos los casos de su serie de 55 pacientes con EI<sup>55</sup>.

## 5.1.6 Diagnóstico histopatológico y microbiológico en pacientes con EI

Numerosos estudios insisten en la importancia del estudio histopatológico en el diagnóstico de la EI. Incluso hay autores que defienden que, en caso de que se conozca la etiología de la infección y se disponga de antibiograma, no son necesarios más estudios microbiológicos sobre la válvula, pero sí que recomiendan el estudio anatomopatológico<sup>49</sup>.

En nuestra serie, en el 83,9% de los casos de EI definitiva se observaron en la muestra lesiones compatibles con EI (26/31). En el estudio de Lamas el diagnóstico histológico definitivo se estableció para válvulas en el 70% de los casos (35/50)<sup>21</sup> y en el de Shrestha en un 93,1% (162/174)<sup>113</sup>.

De los 26 pacientes con signos anatomopatológicos de EI de nuestra serie, el 92% (24/26) presentaron alguna técnica microbiológica positiva; hemocultivo (80,8%) o PCR universal (80,8%). Por otro lado, en todos los pacientes con EI definitiva en los que no se identificaron signos compatibles con EI por histopatología, se detectó el agente causal por PCR y hemocultivo (5/5). En otros trabajos, sin embargo, sí que se observa una mayor sensibilidad del diagnóstico molecular en pacientes con histopatología positiva. Rovey *et al.* recogen una sensibilidad del diagnóstico molecular significativamente mayor en válvulas con lesiones histológicas indicativas de EI [67% (64/95) vs. 38% (21 de 55); ( $p < 0,001$ )]<sup>86</sup>. El grupo de Kerkhoff, que realiza un estudio retrospectivo sobre la prueba del 16S en distintos tipos de muestra, describe que todos los resultados positivos de PCR universal basados en tejidos excepto uno (98,5%; 65/66) demostraron inflamación en la histopatología, con patrones inflamatorios característicos del patógena causal<sup>70</sup>. Este sería el caso

de *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii* y *Tropheryma whippelii*, que presentan un patrón típico que muestra inflamación crónica, con predominio de infiltración mononuclear y frecuente observación de macrófagos, de tipo espumoso fundamentalmente en el caso de *Tropheryma whippelii*<sup>49</sup>.

En la serie de Fournier de 119 pacientes con hemocultivo negativo, incluyeron en el estudio anatomopatológico una técnica inmunohistoquímica empleando anticuerpos policlonales específicos frente a *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Coxiella burnetii* y *Tropheryma whippelii*<sup>84</sup>. Aunque en este trabajo la inmunohistoquímica no aportó ningún diagnóstico que no se hubiera identificado por PCR, en otros estudios anteriores del mismo grupo, sí que había mostrado utilidad <sup>122</sup>.

### 5.2 Pacientes con Endocarditis Infecciosa posible

En el paciente nº53, la ecocardiografía inicial mostró una imagen compatible con pseudoaneurisma y en el hemocultivo se aisló *Staphylococcus hominis*. Sin embargo, la PCR universal resultó negativa, coincidiendo con la valoración macroscópica de la válvula en el momento de la cirugía y con los resultados de la tinción de Gram y del cultivo. Desafortunadamente no se realizó estudio anatomopatológico. En este caso la PCR permitiría descartar la EI, y contradice a los autores que abogan por no realizar pruebas diagnósticas sobre la válvula en pacientes que presentan un aislamiento en hemocultivo, como Liesman *et al*<sup>49</sup>.

En el otro caso de EI posible, paciente nº54, no se realizó hemocultivo ni examen histopatológico, pero el resultado de la PCR universal del tejido valvular fue

positiva y se detectó *Streptococcus anginosus*. Este resultado coincidió con el cultivo de tejido valvular y la tinción de Gram, en la que se observaron cocos grampositivos.

Destacamos la importancia de la visión de la tinción de Gram en esta situación para corroborar los resultados del cultivo y de la PCR. Sin embargo, cabe señalar que se han descrito algunos casos de pacientes con antecedentes de EI en los que la tinción de Gram y la PCR resultaron positivas. Morris *et al.* encontraron que, en algunos pacientes con EI aparentemente curada, con cultivos de válvulas estériles y sin signos histológicos de EI, se observaron microorganismos en la tinción de Gram de la válvula y la PCR universal fue positiva, por lo que los resultados de estas técnicas deben interpretarse con cautela<sup>86,123</sup>. En nuestro caso, sin embargo, en el estudio histopatológico sí que se detectaron signos compatibles con EI.

### 5.3 Pacientes sin Endocarditis Infecciosa

#### 5.3.1 PCR universal y secuenciación en pacientes sin EI

La PCR 16S seguida de secuenciación resultó negativa en todas las muestras de los pacientes del grupo control y en 12 de los 15 pacientes del grupo de estudio en los que por criterios de Duke se descartó la EI. En los otros tres pacientes del grupo de estudio, se detectó *Streptococcus* spp. mediante técnicas moleculares. Dos de estos pacientes presentaban antecedentes de EI por *Streptococcus* spp. (pacientes nº56 y nº60), por lo que este resultado no se asumió como un falso positivo de la técnica, ya que algunos estudios afirman que el ADN bacteriano puede persistir en tejido

valvular de pacientes tratados correctamente de EI incluso años después de haber completado la pauta antibiótica<sup>49</sup>. Lamas recomienda no realizar la PCR en válvulas de pacientes en los que no se sospeche EI, ya que puede mostrar positividad como resultado de infecciones pasadas<sup>21</sup>. Rovey *et al.* observaron que, a medida que transcurre el tiempo entre el tratamiento exitoso de la EI y la cirugía valvular, la probabilidad de detectar ADN bacteriano en las válvulas disminuye, pero encontraron diferencias entre microorganismos. Señalan que los pacientes con EI por *Streptococcus* grupo *viridans* y *Streptococcus* grupo *bovis*, tenían más probabilidades de tener una PCR positiva que los pacientes infectados con estafilococos coagulasa negativa, lo que indicaría que el ADN de estos estreptococos persiste más tiempo que el ADN de otras especies. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito en nuestro trabajo. Cabe señalar, que hubo un paciente con antecedentes de EI por *Streptococcus agalactiae*, en el que la PCR 16S resultó negativa (paciente nº62). No conocemos la razón con certeza; podría tener relación con la clase de alteración anatomopatológica de la válvula, de tipo agudo o crónico. También se podría relacionar con el tiempo de evolución de la infección en el momento de iniciar el tratamiento antibiótico.

Respecto a la técnica de PCR 18S, no se detectó el gen en ninguna de las muestras de pacientes en los que la EI estaba descartada (10 del grupo de estudio y 43 del grupo control), lo que no concuerda con otros estudios en los que se han descrito falsos positivos de la técnica como se ha comentado previamente<sup>113,117</sup>.

### 5.3.1.1 Falsos positivos de la PCR 16S en pacientes sin EI

La técnica de PCR 16S fue positiva, se detectó *Streptococcus* spp., en un paciente en el que se descartó la infección y en el que no constaban antecedentes de EI. Cabe señalar que en otro paciente con EI descartada hubo amplificación del gen 16S ARNr pero no se identificó ningún microorganismo en la secuenciación. En el resto de pacientes y en las 43 muestras del grupo control, la PCR 16S resultó negativa. Como se ha comentado, los *Streptococcus* spp., forma parte de la microbiota orofaríngea habitual del ser humano y es posible la contaminación de la muestra en algún punto del procedimiento. En el estudio de Le Guern, que recoge 10 pacientes con EI descartada según los criterios de Duke modificados, también se describe un caso en el que se amplificó el ADN de *Streptococcus mitis/oralis* en uno de los 19 pacientes del grupo control <sup>110</sup>.

### 5.3.2 Diagnóstico microbiológico clásico y molecular en pacientes sin EI

En cuanto al diagnóstico clásico, una limitación importante del grupo de estudio con EI descartadas, es que el hemocultivo sólo se realizó en 3 de los 15 pacientes. Hay que señalar que, de los 12 pacientes que no tienen hemocultivo, 5 fueron intervenidos de urgencia y posteriormente se descartó la EI sin necesidad de ampliar los estudios microbiológicos. En otros dos pacientes se apreció un aspecto macroscópico compatible con EI en el momento de la cirugía, dos pacientes tenían antecedentes de EI y en los tres restantes no se recogen datos en la historia clínica quirúrgica que justifique por qué se remitió la muestra para estudio microbiológico. Respecto al cultivo de la válvula, teniendo en cuenta todos los cultivos de pacientes con EI descartada (15 del grupo de estudio y 43 del grupo control), el porcentaje de

contaminaciones fue del 12,1% (7/58), superior al del grupo de pacientes con EI definitiva, que fue del 7,7% (4/52).

Por último, la tinción de Gram de tejido valvular, como ya se ha comentado, presentó un elevado VPP, 100% (IC 95%: 74,7-100%), y no se observaron microorganismos en ninguna de las muestras del grupo control ni en ninguno de los 10 pacientes del grupo de estudio con EI descartada en los que se realizó la tinción.

### 5.3.3 Diagnóstico histopatológico y microbiológico en pacientes sin EI

En total se realizó el estudio de anatomía patológica en 49 muestras de pacientes sin diagnóstico de EI, 6 del grupo de estudio y 43 del grupo control.

Se identificaron células inflamatorias en tejido valvular en 3 pacientes del grupo de estudio, pero los estudios microbiológicos (tinción de Gram, cultivo y PCR universal) resultaron negativos.

De los pacientes en los que se detectó ADN de *Streptococcus* spp., sólo se realizó el estudio histopatológico en un paciente con antecedentes de EI por *Streptococcus mitis/oralis* (paciente nº56), y fue negativo. En los otros dos casos hubiera sido de gran utilidad el estudio anatomopatológico para valorar el resultado de la PCR.

## **6 CONCLUSIONES**

- La PCR universal seguida de secuenciación es una técnica valiosa en el diagnóstico actual de la EI. En el presente trabajo, ha permitido identificar el agente causal o confirmar el diagnóstico etiológico en caso de discordancia entre los resultados del cultivo de sangre y de tejido valvular en el 7,7% de los casos, y ha afianzado el diagnóstico en los pacientes con EI descartada.
- La realización de la PCR universal seguida de secuenciación en más de una muestra valvular ha aumentado la sensibilidad de la técnica y podría ser especialmente útil en los pacientes en los que se desconoce el agente etiológico en el momento de la cirugía.
- La PCR universal seguida de secuenciación en tejido valvular ha presentado una sensibilidad y una especificidad significativamente mayor que el cultivo valvular, por lo que debería ser incluida y tener más peso que dicho cultivo en los criterios de Duke modificados.
- En el presente estudio el hemocultivo sigue siendo la técnica microbiológica que presenta una mayor sensibilidad de forma aislada. Constituye la piedra angular del diagnóstico etiológico y además permite conocer el perfil de sensibilidad antimicrobiana.
- La tinción de Gram, ha presentado un excelente valor predictivo positivo y ha permitido valorar los resultados moleculares, teniendo en cuenta la persistencia del material genético de los microorganismos en el tejido.

- El diagnóstico microbiológico ha presentado la mayor sensibilidad y especificidad cuando se ha considerado conjuntamente la microbiología clásica y las técnicas moleculares, por lo que ambos procedimientos se deberían realizar de forma paralela siempre que sea posible.
- Es aconsejable la realización del estudio anatomopatológico en tejido valvular, por su valor intrínseco y porque permite valorar los resultados del diagnóstico microbiológico cuando existen discordancias.
- En una entidad tan compleja como la EI, es necesario utilizar todas las herramientas diagnósticas a nuestro alcance. Todas las áreas de diagnóstico de laboratorio son complementarias y no excluyentes, y deberían ser valoradas conjuntamente.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles And Practice Of Infectious Diseases*. 7th ed. (Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds.). Churchill Livingstone; 2010.
2. Cuervo G, Escrihuela-Vidal F, Gudiol C, Carratalà J. Current Challenges in the Management of Infective Endocarditis. *Front Med*. 2021;8(February):1-15. doi:10.3389/fmed.2021.641243
3. Di Domenico EG, Rimoldi SG, Cavallo I, et al. Microbial biofilm correlates with an increased antibiotic tolerance and poor therapeutic outcome in infective endocarditis. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):1-10. doi:10.1186/s12866-019-1596-2
4. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;11(3-4):217-221. doi:10.1016/S0924-8579(99)00018-7
5. Elgharably H et al. Current Hypotheses in Cardiac Surgery: Biofilm in Infective Endocarditis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;28(1). doi:10.1053/j.semtcvs.2015.12.005
6. Nappi F, Martuscelli G, Bellomo F, Singh S, Singh A, Moon MR. Infective Endocarditis in High-Income Countries. *Metabolites*. 2022;12:682.
7. Ambrosioni J, Hernandez-Meneses M, Téllez A, et al. The Changing Epidemiology of Infective Endocarditis in the Twenty-First Century. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19(5). doi:10.1007/s11908-017-0574-9
8. Navas Elorza E, Plaza Coya C, Martín Dávila P, Moya Mur JL, Moreno Guillén S. Análisis Retrospectivo de los casos de Endocarditis Infecciosa a lo largo de 31 años (1985-2016) en un Hospital Terciario (Ramón y Cajal). *Rev Investig y Educ en Ciencias la Salud*. 2018;3(1):22-33. doi:10.37536/riecs.2018.3.1.73
9. Talha KM, Baddour LM, Thornhill MH, et al. Escalating incidence of infective endocarditis in Europe in the 21st century. *Open Hear*. 2021;8(2). doi:10.1136/openhrt-2021-001846
10. Hubers SA, DeSimone DC, Gersh BJ, Anavekar NS. Infective Endocarditis: A Contemporary Review. *Mayo Clin Proc*. 2020;95(5):982-997. doi:10.1016/j.mayocp.2019.12.008
11. Muñoz P, Kestler M, De Alarcón A, et al. Current epidemiology and outcome of infective endocarditis: A multicenter, prospective, cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(43):1-8. doi:10.1097/MD.0000000000001816
12. Olmos C, Vilacosta I, Fernández-Pérez C, et al. The Evolving Nature of Infective Endocarditis in Spain: A Population-Based Study (2003 to 2014). *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(22):2795-2804. doi:10.1016/j.jacc.2017.10.005
13. Ortega-Loubon C, Muñoz-Moreno MF, García IA, et al. Nosocomial vs. Community-acquired infective endocarditis in Spain: Location, trends, clinical presentation, etiology, and survival in the 21st century. *J Clin Med*. 2019;8(10):1-15. doi:10.3390/jcm8101755
14. Habib G, Erba PA, Iung B, et al. Clinical presentation, aetiology and outcome of infective endocarditis. Results of the ESC-EORP EURO-ENDO (European infective endocarditis) registry: A prospective cohort study. *Eur Heart J*. 2019;40(39):3222-3232B. doi:10.1093/eurheartj/ehz620
15. Erdem H, Puca E, Ruch Y, et al. Portraying infective endocarditis: results of multinational ID-IRI study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(9):1753-1763. doi:10.1007/s10096-019-03607-x
16. Tornos P, Iung B, Permanyer-Miralda G, et al. Infective endocarditis in Europe: lessons from the Euro heart survey. *Heart*. 2005;91(5):571-575. doi:10.1136/hrt.2003.032128
17. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *Lancet*. 2016;387(10021):882-893. doi:10.1016/S0140-6736(15)00067-7

18. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, et al. Preeminence of staphylococcus aureus in infective endocarditis: A 1-year population-based survey. *Clin Infect Dis*. 2012;54(9):1230-1239. doi:10.1093/cid/cis199
19. Wurcel AG, Anderson JE, Chui KKH, et al. Increasing infectious endocarditis admissions among young people who inject drugs. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3(3):19-21. doi:10.1093/ofid/ofw157
20. Jordal S, Kittang B, Salminen PR, et al. Infective endocarditis in Western Norway: a 20-year retrospective survey. *Infect Dis (Lond)*. 2018;50. doi:10.1080/23744235.2018.1482419
21. Lamas CC, Fournier PE, Zappa M, et al. Diagnosis of blood culture-negative endocarditis and clinical comparison between blood culture-negative and blood culture-positive cases. *Infection*. Published online 2015. doi:10.1007/s15010-015-0863-x
22. Murdoch DR, Corey RG, Hoen B, et al. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century The international collaboration on Endocarditis-prospective cohort study. *Arch Intern Med*. 2009;169(5):463-473. doi:10.1001/archinternmed.2008.603
23. Mestres CA, Pare JC, Miro JM. Organización y funcionamiento de un grupo multidisciplinario de diagnóstico y tratamiento de la endocarditis infecciosa: perspectiva de 30 años (1985–2014). *Rev Argent Microbiol*. 2015;68(5):363-368.
24. Fernández-Hidalgo, Nuria Almirante B, Tornos P, Pigrau C, Sambola A, Igual A, Pahissa A. Contemporary epidemiology and prognosis of health care-associated infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1287-1297. doi:10.1086/592576
25. Sohail MR, Uslan DZ, Khan AH, et al. Infective endocarditis complicating permanent pacemaker and implantable cardioverter-defibrillator infection. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(1):46-53. doi:10.4065/83.1.46
26. Lomas JM, Martínez-Marcos FJ, Plata A, et al. Healthcare-associated infective endocarditis: An undesirable effect of healthcare universalization. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(11):1683-1690. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03043.x
27. Mensa J, Soriano A, Marco F, López-Suñé E. *Guía Mensa de Terapéutica Antimicrobiana*. Antares; 2022.
28. Fernández-Hidalgo N, Escolà-Vergé L, Pericàs JM. Enterococcus faecalis endocarditis: What's next? *Future Microbiol*. 2020;15(5):349-364. doi:10.2217/fmb-2019-0247
29. Ruoff KL, Miller SI, Garner C V., Ferraro MJ, Calderwood SB. Bacteremia with Streptococcus bovis and Streptococcus salivarius: Clinical correlates of more accurate identification of isolates. *J Clin Microbiol*. 1989;27(2):305-308. doi:10.1128/jcm.27.2.305-308.1989
30. Dekker JP, Lau AF. An update on the streptococcus bovis group: Classification, identification, and disease associations. *J Clin Microbiol*. 2016;54(7):1694-1699. doi:10.1128/JCM.02977-15
31. Revest M, Egmann G, Cattoir V, Tattevin P. HACEK endocarditis: state-of-the-art. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14(5):523-530. doi:10.1586/14787210.2016.1164032
32. Melenotte C, Protopopescu C, Million M, et al. Clinical Features and Complications of Coxiella burnetii Infections from the French National Reference Center for Q Fever. *JAMA Netw Open*. 2018;1(4):1-22. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.1580
33. Marth T, Moos V, Müller C, Biagi F, Schneider T. Tropheryma whipplei infection and Whipple's disease. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):e13-e22. doi:10.1016/S1473-3099(15)00537-X
34. Fenollar F, Célard M, Lagier JC, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. Tropheryma whipplei endocarditis. *Emerg Infect Dis*. 2013;9(11):1721-1730. doi:http://dx.doi.org/10.3201/eid1911.121356

35. Edouard S, Nabet C, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. Bartonella, a common cause of endocarditis: A report on 106 cases and review. *J Clin Microbiol.* 2015;53(3):824-829. doi:10.1128/JCM.02827-14
36. Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of Bartonella quintana and Bartonella henselae endocarditis: A study of 48 patients. *Medicine (Baltimore).* 2001;80(4):245-251. doi:10.1097/00005792-200107000-00003
37. Ammannaya GKK, Sripad N. Fungal endocarditis: What do we know in 2019? *Kardiologia Pol.* 2019;77(7-8):670-673. doi:10.33963/KP.14869
38. Pasha AK, Lee JZ, Low SW, Desai H, Lee KS, Al Mohajer M. Fungal Endocarditis: Update on Diagnosis and Management. *Am J Med.* 2016;129(10):1037-1043. doi:10.1016/j.amjmed.2016.05.012
39. Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: Utilization of specific echocardiographic findings. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994;52(11):1225. doi:10.1016/0278-2391(94)90556-8
40. Li JS, Sexton DJ, Mick N, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2000;30(4):633-638. doi:10.1086/313753
41. Shrestha N, Shakya S, Hussain S, Pettersson G, Griffin B, Gordon S. Sensitivity and Specificity of Duke Criteria for Diagnosis of Definite Infective Endocarditis: A Cohort Study. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(suppl\_1):S550-S551. doi:10.1093/ofid/ofx163.1431
42. Lamas CC, Eykyn SJ. Suggested modifications to the Duke criteria for the clinical diagnosis of native valve and prosthetic valve endocarditis: Analysis of 118 pathologically proven cases. *Clin Infect Dis.* 1997;25(3):713-719. doi:10.1086/513765
43. Pérez-Vázquez A, Fariñas MC, Garcia-Palomo JD, Bernal JM, Revuelta JM, González-Macías J. Evaluation of the duke criteria in 93 episodes of prosthetic valve endocarditis: Could sensitivity be improved? *Arch Intern Med.* 2000;160(8):1185-1191. doi:10.1001/archinte.160.8.1185
44. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, et al. *2015 ESC Guidelines for the Management of Infective Endocarditis.* Vol 36.; 2015. doi:10.1093/eurheartj/ehv319
45. Adler Y, Charron P, Italia MI, et al. Guía ESC 2015 sobre el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del pericardio. *Rev Esp Cardiol.* 2017;68(12).
46. Doherty JU, Kort S, Mehran R, Schoenhagen P, Soman P. ACC/AATS/AHA/ASE/ASNC/HRS/SCAI/SCCT/SCMR/STS 2017 Appropriate Use Criteria for Multimodality Imaging in Valvular Heart Disease : A Report of the American College of Cardiology Appropriate Use Criteria Task Force, American Association for Thoracic Surgery,. *J Nucl Cardiol.* 2017;24(6):2043-2063. doi:10.1007/s12350-017-1070-1
47. Eudailey K, Lewey J, Hahn RT Gl. Aggressive infective endocarditis and the importance of early repeat echocardiographic imaging. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;147:e26-e28.
48. Marcos-Garces V, Gabaldon-Perez A, Merenciano-Gonzalez H, et al. Applicability of Echocardiographic Strict Negative Criteria for Suspected Infective Endocarditis. *Am J Cardiol.* 2022;162:156-162. doi:10.1016/J.AMJCARD.2021.09.012
49. Liesman RM, Pritt BS, Maleszewski JJ, Patel R. Laboratory Diagnostis of Endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2017;55(9):2599-2608.
50. Lepidi H, Houpiqian P, Liang Z, Raoult D. *Cardiac Valves in Patients with Q Fever Endocarditis: Microbiological, Molecular, and Histologic Studies.* Vol 187.; 2003. <https://academic.oup.com/jid/article/187/7/1097/800031>
51. Fournier PE, Thuny F, Richet H, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis.*

- 2010;51(2):131-140. doi:10.1086/653675
52. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(1):177-207. doi:10.1128/CMR.14.1.177-207.2001
  53. Raoult D, Casalta JP, Richet H, et al. Contribution of Systematic Serological Testing in Diagnosis of Infective Endocarditis Contribution of Systematic Serological Testing in Diagnosis of Infective Endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5238-5242. doi:10.1128/JCM.43.10.5238
  54. Díez-Villanueva P, Muñoz P, Marín M, et al. Infective endocarditis: Absence of microbiological diagnosis is an independent predictor of inhospital mortality. *Int J Cardiol.* 2016;220:162-165. doi:10.1016/j.ijcard.2016.06.129
  55. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, et al. Molecular Diagnosis of Infective Endocarditis by Real-Time Broad-Range Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing Directly From Heart Valve Tissue. *Medicine (Baltimore).* 2007;86(4):195-202. doi:10.1097/MD.0b013e31811f44ec
  56. Houpikian P, Raoult D. Blood Culture-Negative Endocarditis in a Reference Center. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(3):162-173. doi:10.1097/01.md.0000165658.82869.17
  57. Millar BC, Habib G, Moore JE. New diagnostic approaches in infective endocarditis. *Heart.* 2016;(box 1):heartjnl-2014-307021. doi:10.1136/heartjnl-2014-307021
  58. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (80- ).* 1985;230:1350-1354.
  59. Ramírez-Pacheco A, Moreno-Guerrero SS, Medina-Sanson A. Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gac Mex Oncol.* 2013;12(3):162-173.
  60. Clinical and Laboratory Standards Institute. *MM09-A2 Nucleic Acid Sequencing Methods in Diagnostic Laboratory Medicine; Approved Guideline-Second Edition.*; 2014.
  61. Rodicio MDR, Mendoza MDC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(4):238-245. doi:10.1157/13059055
  62. Woese CR, Kandlert O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:4576-4579.
  63. Clinical and Laboratory Standards Institute. *MM18-A Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline.*; 2008.
  64. Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis.* 2007;44(8):1108-1114. doi:10.1086/512818
  65. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* Published online 1994:846-849. doi:10.1016/S0140-6736(01)43317-4
  66. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(16):5261-5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
  67. Izquierdo Altarejos P. Trabajo Final de Grado: Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms. Published online 2015:42. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANDREA VAZQUEZ ESCRIBANO.pdf>
  68. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463-5467. doi:10.1097/00006250-199004001-00013
  69. Church DL. Principles of Capillary-Based Sequencing for Clinical Microbiologists. *Clin Microbiol News.* 2013;35(2):11-18. doi:10.1016/j.clinmicnews.2012.12.003
  70. Kerkhoff AD, Rutishauser RL, Miller S, Babik JM. Clinical utility of universal broad-range polymerase chain reaction amplicon sequencing for pathogen identification: A

- retrospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2020;71(6):1554-1557. doi:10.1093/cid/ciz1245
71. Goldenberger D, Kunzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2733-2739. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9350723](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9350723)
  72. Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, Raoult D, Earle J, Hone R MP. Molecular diagnosis of infective endocarditis-a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(9):673-680.
  73. Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R, Ruef C, Bottger EC, Altwegg M. Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. *Clin Infect Dis.* 2003;37(2):167-172. doi:CID30472 [pii]\n10.1086/375592
  74. Grijalva M, Horváth R, Dendis M, Erný J, Benedík J. Molecular diagnosis of culture negative infective endocarditis: clinical validation in a group of surgically treated patients. *Heart.* 2003;89(3):263-268. doi:10.1136/heart.89.3.263
  75. Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, et al. Molecular Diagnosis of Infective Endocarditis by PCR Amplification and Direct Sequencing of DNA from Valve Tissue Molecular Diagnosis of Infective Endocarditis by PCR Amplification and Direct Sequencing of DNA from Valve Tissue. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):763-766. doi:10.1128/JCM.41.2.763
  76. Breikopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation.* 2005;111(11):1415-1421. doi:10.1161/01.CIR.0000158481.07569.8D
  77. Greub G, Lepidi H, Rovey C, et al. Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. *Am J Med.* 2005;118(3):230-238. doi:10.1016/j.amjmed.2004.12.014
  78. Siciliano RF, Castelli JB, Mansur AJ, et al. Bartonella spp. and Coxiella burnetii Associated with Community-Acquired, Culture-Negative Endocarditis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1429-1432.
  79. Miller RJH, Chow B, Pillai D, Church D. Development and evaluation of a novel fast broad-range 16S ribosomal DNA PCR and sequencing assay for diagnosis of bacterial infective endocarditis: multi-year experience in a large Canadian healthcare zone and a literature review. *BMC Infect Dis.* 2016;16(146). doi:10.1186/s12879-016-1476-4
  80. Boussier R, Rogez S, François B, Denes E, Ploy MC, Garnier F. Two-step bacterial broad-range polymerase chain reaction analysis of heart valve tissue improves bacteriological diagnosis of infective endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75(3):240-244. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.013
  81. Frickmann H, Dekker D, Schwarz NG, et al. 16S rRNA gene sequence-based identification of bacteria in automatically incubated blood culture materials from tropical sub-saharan Africa. *PLoS One.* 2015;10(8):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0135923
  82. Hassan RM, El Enany MG, Rizk HH. Evaluation of broad-range 16S rRNA PCR for the diagnosis of bloodstream infections: Two years of experience. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(10):1252-1258. doi:10.3855/jidc.4867
  83. Decuyper S, Meehan CJ, Van Puyvelde S, et al. Diagnosis of Bacterial Bloodstream Infections: A 16S Metagenomics Approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):1-12. doi:10.1371/journal.pntd.0004470
  84. Fournier PE, Gouriet F, Casalta JP, et al. Blood culture-negative endocarditis: Improving the diagnostic yield using new diagnostic tools. *Medicine (Baltimore).*

- 2017;96(47):e8392.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29381916>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5708915>
85. Opota O, Jatón K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: Towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(4):323-331. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.005
  86. Röver C, Greub G, Lepidi H, et al. PCR Detection of Bacteria on Cardiac Valves of Patients with Treated Bacterial Endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):163-167. doi:10.1128/JCM.43.1.163
  87. Chirillo F. New approach to managing infective endocarditis. *Trends Cardiovasc Med.* Published online 2020. doi:10.1016/j.tcm.2020.04.008
  88. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, et al. *Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association.* Vol 132.; 2015. doi:10.1161/CIR.0000000000000296
  89. Luque Paz D, Lakbar I, Tattevin P. A review of current treatment strategies for infective endocarditis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2020;19(3):297-307. doi:10.1080/14787210.2020.1822165
  90. El-Dalati S, Cronin D, Shea M, et al. Clinical Practice Update on Infectious Endocarditis. *Am J Med.* 2020;133(1):44-49. <https://doi.org/10.1016/j.bcra.2021.100006>
  91. Heldman AW, Hartert T V., Ray SC, et al. Oral antibiotic treatment of right-sided staphylococcal endocarditis in injection drug users: Prospective randomized comparison with parenteral therapy. *Am J Med.* 1996;101(1):68-76. doi:10.1016/S0002-9343(96)00070-8
  92. Iversen K, Ihlemann N, Gill SU, et al. Partial Oral versus Intravenous Antibiotic Treatment of Endocarditis. *N Engl J Med.* 2019;163(15):415-424. doi:10.1056/NEJMoa1808312
  93. Rao VP, Wu J, Gillott R, Wazir Baig M, Kaul P, Sandoe JAT. Impact of the duration of antibiotic therapy on relapse and survival following surgery for active infective endocarditis. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2019;55(4):760-765. doi:10.1093/ejcts/ezy325
  94. Tobudic S, Forstner C, Burgmann H, Lagler H, Ramharter M. Dalbavancin as Primary and Sequential Treatment for Gram-Positive Infective Endocarditis: 2-Year Experience at the General Hospital of Vienna. *Clin Infect Dis.* 2018;67(5):795-798. doi:10.1093/cid/ciy279/4961493
  95. Jones T, Baumgartner L, Bellows M. Prevention of rheumatic fever and bacterial endocarditis. *Circula.* 1960;21:317-320.
  96. NICE. Prophylaxis against infective endocarditis Antimicrobial prophylaxis against infective endocarditis in adults and children. *Natl Inst Clin Excell Guidel* 64. 2008;(March):1-107. [papers3://publication/uuid/42FCFEA6-9616-44E2-84A0-21074528BE46](https://www.nice.org.uk/guidance/psg3/papers3://publication/uuid/42FCFEA6-9616-44E2-84A0-21074528BE46)
  97. Quan TP, Muller-Pebody B, Fawcett N, et al. Investigation of the impact of the NICE guidelines regarding antibiotic prophylaxis during invasive dental procedures on the incidence of infective endocarditis in England: An electronic health records study. *BMC Med.* 2020;18(1):1-17. doi:10.1186/s12916-020-01531-y
  98. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol.* 2021;82(11):801-811. doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012
  99. Kolb M, Lazarevic V, Emonet S, et al. Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Challenging Culture-Negative Endocarditis. *Front Med.* 2019;6(September):8-11. doi:10.3389/fmed.2019.00203
  100. Santibáñez P, García-García C, Portillo A, et al. What Does 16S rRNA Gene-Targeted

- Next Generation Sequencing Contribute to the Study of Infective Endocarditis in Heart-Valve Tissue? *Pathogens*. 2022;11(1). doi:10.3390/pathogens11010034
101. Kulkarni S, Seneviratne N, Baig MS, Khan AHA. Artificial Intelligence in Medicine: Where Are We Now? *Acad Radiol*. 2020;27(1):62-70. doi:10.1016/j.acra.2019.10.001
  102. de Cueto López M, del Pozo León JL, Franco Alvarez de Luna F, Marín Arriaza M. *Procedimiento Microbiología Clínica SEIMC. Diagnóstico Microbiológico de Las Infecciones Asociadas a Dispositivos Biomédicos.*; 2015. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia35.pdf>
  103. Xu J, Millar BC, Moore JE, et al. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis - Rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol*. 2003;94(2):197-206. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01839.x
  104. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1353-1360. doi:10.1128/jcm.35.6.1353-1360.1997
  105. To H, Kako N, Zhang GQ, et al. Q fever pneumonia in children in Japan . These include : Q Fever Pneumonia in Children in Japan. *J Clin Microbiol*. 1996;34(3):647-651.
  106. Matar GM, Koehler JE, Malcolm G, et al. Identification of Bartonella species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. *J Clin Microbiol*. 1999;37(12):4045-4047.
  107. Hinrikson HP, Dutly F, Altwegg M. Evaluation of a specific nested PCR targeting domain III of the 23S rRNA gene of "Tropheryma whippelii" and proposal of a classification system for its molecular variants. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):595-599.
  108. Abraira V. notas estadísticas. :247-249.
  109. Chen W, Dilsizian V. Molecular imaging of cardiovascular device infection: Targeting the bacteria or the host-pathogen immune response? *J Nucl Med*. 2020;61(3):319-326. doi:10.2967/JNUMED.119.228304
  110. Le Guern R, Loiez C, Armand S, Marceau L, Courcol R, Wallet F. Infective endocarditis: does a new 16S rDNA set of primers improve the microbiological diagnosis? *Infect Dis (Auckl)*. 2015;47(12):896-901. doi:10.3109/23744235.2015.1075661
  111. Mularoni A, Mikulska M, Barbera F, et al. Molecular Analysis With 16S rRNA PCR/Sanger Sequencing and Molecular Antibigram Performed on DNA Extracted From Valve Improve Diagnosis and Targeted Therapy of Infective Endocarditis: A Prospective Study. *Clin Infect Dis*. Published online 2022:6-8. doi:10.1093/cid/ciac452
  112. Maneg D, Sponsel J, Müller I, et al. Advantages and limitations of direct PCR amplification of bacterial 16S-rDNA from resected heart tissue or swabs followed by direct sequencing for diagnosing infective endocarditis: A retrospective analysis in the routine clinical setting. *Biomed Res Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/7923874
  113. Shrestha NK, Ledtke CS, Wang H, et al. Heart valve culture and sequencing to identify the infective endocarditis pathogen in surgically treated patients. *Ann Thorac Surg*. 2015;99(1):33-37. doi:10.1016/j.athoracsur.2014.07.028
  114. Kim MS, Chang J, Kim MN, et al. Utility of a direct 16S rDNA PCR and sequencing for etiological diagnosis of infective endocarditis. *Ann Lab Med*. 2017;37(6):505-510. doi:10.3343/alm.2017.37.6.505
  115. Peeters B, Herijgers P, Beuselinck K, et al. Added diagnostic value and impact on antimicrobial therapy of 16S rRNA PCR and amplicon sequencing on resected heart valves in infective endocarditis: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(11):888.e1-888.e5. doi:10.1016/j.cmi.2017.06.008
  116. Edwards KJ, Logan JMJ, Langham S, Swift C, Gharbia SE. Utility of real-time amplification

- of selected 16S rRNA gene sequences as a tool for detection and identification of microbial signatures directly from clinical samples. *J Med Microbiol.* 2012;61(5):645-652. doi:10.1099/jmm.0.041764-0
117. Stempak LM, Vogel SA, Richter SS, Wyllie R, Procop GW. Routine Broad-Range Fungal Polymerase Chain Reaction With DNA Sequencing in Patients With Suspected Mycoses Does Not Add Value and Is Not Cost-Effective. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(5):634-638. doi:10.5858/arpa.2017-0299-0a
  118. Chin YT, Hasan R, Qamruddin A. 16S rRNA PCR for the diagnosis of culture-negative Bartonella quintana endocarditis: The importance of sample type. *Indian J Med Microbiol.* 2015;33(1):185-186. doi:10.4103/0255-0857.148429
  119. Rovey C, Greub G, Lepidi H, et al. PCR Detection of Bacteria on Cardiac Valves of Patients with Treated Bacterial Endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):163-167. doi:10.1128/JCM.43.1.163-167.2005
  120. Morel AS, Dubourg G, Prudent E, et al. Complementarity between targeted real-time specific PCR and conventional broad-range 16S rDNA PCR in the syndrome-driven diagnosis of infectious diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(3):561-570. doi:10.1007/s10096-014-2263-z
  121. Lang S, Watkin RW, Lambert PA, Bonser RS, Littler WA, Elliott TSJ. Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis. *J Infect.* Published online 2004. doi:10.1016/S0163-4453(03)00102-6
  122. Fournier PE, Thuny F, Richet H, et al. Comprehensive Diagnostic Strategy for Blood Culture–Negative Endocarditis: A Prospective Study of 819 New Cases. *Clin Infect Dis.* 2010;51(2):131-140. doi:10.1086/653675
  123. Morris AJ, Drinkovic D, Pottumarthy S, et al. Gram stain, culture, and histopathological examination findings for heart valves removed because of infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2003;36(6):697-704. doi:10.1086/367842



## 8.1 Anexo 1. Datos de los pacientes del grupo de estudio

Tabla 23. Pacientes con diagnóstico de EI definitiva.

Nº paciente	Sexo	Edad	Etiología	Tipo de muestra	PCR universal y secuenciación	Hemocultivo	Tinción Gram	Cultivo de tejido/ prótesis valvula	Estudio AP células inflamatorias/ signos EI	Contribución de la PCR al diagnóstico
1	H	46	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Leucocitos/CGP	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sí	Confirmación
2	H	63	<i>Staphylococcus capitis</i>	Tejido válvula mitral	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	Leucocitos/CGP	<i>Staphylococcus capitis</i>	Sí	Confirmación
3	H	72	<i>Candida parapsilosis</i>	Tejido prótesis aórtica	<i>Streptococcus spp. y Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	Leucocitos/ Levaduras	<i>Candida parapsilosis</i>	No	Confirmación
4	H	45	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Vegetación válvula mitral	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Leucocitos/CGP	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	No	Confirmación
5	H	43	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vegetación válvula mitral y tricúspide	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Leucocitos/CGP	<i>Staphylococcus aureus</i>	NR	Confirmación
6	M	65	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vegetación válvula mitral	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGP	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sí	Confirmación
7	M	55	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vegetación válvula tricúspide	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGP	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sí	Confirmación
8	M	75	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vegetación válvula mitral	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	No leucocitos/ CGP	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sí	Confirmación
9	H	71	<i>Candida auris y Staphylococcus haemolyticus</i>	Injerto aorta	<i>Candida auris</i>	<i>Candida auris y Staphylococcus haemolyticus</i>	Leucocitos/No microorganismos	<i>Candida auris</i>	NR	Confirmación
10	H	57	<i>Enterococcus faecalis</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Leucocitos/No microorganismos	<i>Enterococcus faecalis</i>	Sí	Confirmación
11	M	81	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	No leucocitos/No microorganismos	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sí	Confirmación
12	H	49	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGP	Negativo	Sí	Confirmación
13	M	77	<i>Streptococcus anginosus</i>	Tejido prótesis válvula aórtica	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus grupo viridans</i>	Leucocitos/CGP	Negativo	NR	Confirmación

(Continuación Tabla 21. Pacientes con diagnóstico de EI definitiva.)

Nº paciente	Sexo	Edad	Etiología	Tipo de muestra	PCR universal y secuenciación	Hemocultivo	Tinción Gram	Cultivo de tejido/prótesis valvula	Estudio AP células inflamatorias/signos EI	Contribución de la PCR al diagnóstico
14	H	55	<i>Streptococcus mutans</i>	Tejido válvula mitral	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus</i> grupo viridans	Leucocitos/CGP	Negativo	Sí	Confirmación
15	H	50	<i>Streptococcus anginosus</i>	Tejido válvula mitral	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	No leucocitos/CGP	Negativo	Sí	Confirmación
16	H	61	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Tejido válvula mitral	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	No leucocitos/CGP	Negativo	Sí	Confirmación
17	M	80	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tejido prótesis válvula aórtica	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
18	H	66	<i>Enterococcus faecalis</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	No	Confirmación
19	H	73	<i>Streptococcus anginosus</i>	Sonicación prótesis válvula aórtica	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus</i> grupo viridans	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
20	H	64	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	Confirmación
21	H	80	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Válvula aórtica	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
22	H	76	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido prótesis válvula aórtica	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
23	H	63	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sonicación cable marcapasos aurícula 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	No leucocitos	Negativo	NR	Confirmación
24	M	66	<i>Enterococcus faecalis</i>	Tejido prótesis válvula aórtica	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	No	Confirmación
25	M	48	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido prótesis válvula aórtica	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
26	H	59	<i>Granulicatella adiacens</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Granulicatella</i> spp.	<i>Granulicatella adiacens</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	Confirmación
27	M	47	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido válvula tricuspide	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
28	H	79	<i>Enterococcus faecalis</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	Confirmación
29	H	74	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido válvula mitral	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación

(Continuación Tabla 21. Pacientes con diagnóstico de EI definitiva.)

Nº paciente	Sexo	Edad	Etiología	Tipo de muestra	PCR universal y secuenciación	Hemocultivo	Tinción Gram	Cultivo de tejido/ prótesis válvula	Estudio AP células inflamatorias/ signos EI	Contribución de la PCR al diagnóstico
30	H	47	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido derivación ventrículo atrial	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	Confirmación
31	H	68	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tejido prótesis válvula aórtica	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
32	H	53	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NI	Negativo	Sí	Confirmación
33	H	54	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	Negativo	NR	Confirmación
34	H	58	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	Negativo	Sí	Confirmación
35	M	81	<i>Streptococcus gordonii</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	NI	Negativo	No	Confirmación
36	H	25	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Tejido válvula pulmonar	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	NI	Negativo	NR	Confirmación
37	H	71	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tejido prótesis válvula aórtica	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NI	Negativo	NR	Confirmación
38	H	60	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Velo válvula aórtica	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	NI	Negativo	NR	Confirmación
39	M	65	<i>Streptococcus grupo viridans</i>	Tejido válvula mitral	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus grupo viridans</i>	No leucocitos/No microorganismos	<i>Micrococcus luteus</i>	Sí	Resolución
40	M	63	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Tejido válvula mitral	No se detecta	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	-
41	M	71	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido prótesis válvula mitral	No se detecta	<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	Negativo	Sí	-
42	H	58	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Vegetación válvula mitral	No se detecta	<i>Streptococcus sanguinis</i>	No leucocitos/CGP	Negativo	NR	-
43	H	74	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido prótesis válvula mitral	No se detecta	<i>Staphylococcus aureus</i>	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	-
44	H	64	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido válvula mitral	No se detecta	<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Sí	-

(Continuación Tabla 21. Pacientes con diagnóstico de EI definitiva.)

Nº paciente	Sexo	Edad	Etiología	Tipo de muestra	PCR universal y secuenciación	Hemocultivo	Tinción Gram	Cultivo de tejido/ prótesis valvula	Estudio AP células inflamatorias/ signos EI	Contribución de la PCR al diagnóstico
45	M	60	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Tejido válvula mitral	No se detecta	<i>Staphylococcus cohnii</i>	No leucocitos/No microorganismos	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NR	-
46	M	60	<i>Fusarium solani</i>	Tejido cortina mitro-aórtica	<i>Massilia suwonensis</i> y <i>Fusarium spp.</i>	Negativo	No leucocitos/No microorganismos	<i>Fusarium solani</i>	Sí	Confirmación
47	M	38	<i>Haemophilus parainfluenza</i>	Válvula mitral	<i>Haemophilus parainfluenza</i>	Negativo	NI	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Sí	Resolución
48	H	47	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Negativo	CGP	Negativo	Sí	Diagnóstico
49	M	69	<i>Tropheryma whipplei</i>	Tejido prótesis válvula mitral	No se detecta	Negativo	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	-
50	H	35	No filiada	Tejido válvula aórtica	No se detecta	Negativo	Leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	-
51	H	79	<i>Coxiella burnetii</i>	Tejido prótesis válvula mitral	No se detecta	Negativo	No leucocitos/No microorganismos	<i>Enterococcus faecalis</i>	NR	-
52	M	74	No filiada	Absceso prótesis válvula aórtica	No se detecta	<i>Corynebacterium coyleae</i> y <i>Staphylococcus hominis</i>	NI	Negativo	NR	-

Abreviaturas: M= Mujer; H= Hombre; CGP=Cocos Gram positivos; NI=No informado; NR= No realizado

Tabla 24. Pacientes con diagnóstico de EI posible.

Nº paciente	Sexo	Edad	Posible etiología	Tipo de muestra	PCR universal y secuenciación	Hemocultivo	Tinción Gram	Cultivo de tejido/ prótesis valvula	Estudio AP células inflamatorias/ signos EI	Contribución de la PCR al diagnóstico
53	M	82	<i>Staphylococcus hominis</i>	Tejido prótesis válvula aórtica	No se detecta	<i>Staphylococcus hominis</i>	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Descartaría EI
54	H	65	<i>Streptococcus anginosus</i>	Tejido válvula aórtica	<i>Streptococcus anginosus</i>	NR	No leucocitos/CGP	<i>Streptococcus anginosus</i>	NR	Confirmaría EID

Abreviaturas: M= Mujer; H= Hombre; CGP=Cocos Gram positivos; NR= No realizado

Tabla 25. Pacientes con diagnóstico de EI descartada.

Nº paciente	Sexo	Edad	Etiología	Tipo de muestra	PCR universal y secuenciación	Hemocultivo	Tinción Gram	Cultivo de tejido/prótesis valvula	Estudio AP células inflamatorias	Contribución de la PCR al diagnóstico
55	H	73	-	Tejido prótesis válvula mitral	No se detecta	NR	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
56	H	76	El <i>Streptococcus spp.</i> pasada	Tejido válvula aórtica	<i>Streptococcus spp.</i>	Negativo	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	No	-
57	H	63	El <i>Streptococcus spp.</i> pasada	Tejido válvula mitral	<i>Streptococcus spp.</i>	NR	NI	<i>Kocuria palustris</i>	NR	-
58	H	45	-	Tumoración mitral	No se detecta	NR	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	No	Confirmación
59	M	54	-	Velo válvula mitral	No se detecta	NR	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	No	Confirmación
60	H	75	-	Velo válvula mitral	<i>Streptococcus spp.</i>	NR	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	-
61	H	63	-	Trombo prótesis válvula aórtica	No se detecta	NR	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	Confirmación
62	M	67	-	Tejido válvula aórtica	No se detecta	NR	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	Confirmación
63	H	59	-	Tejido injerto y prótesis válvula aorta	No se detecta	Negativo	NI	Negativo	NR	Confirmación
64	M	57	-	Tejido válvula mitral	No se detecta	NR	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	NR	Confirmación
65	H	47	-	Tejido válvula mitral	No se detecta	Negativo	NI	Negativo	NR	Confirmación
66	M	46	-	Tejido prótesis válvula mitral	No se detecta	NR	No leucocitos/No microorganismos	Negativo	Sí	Confirmación
67	H	51	-	Cuerdas tendinosas	No se detecta	NR	NI	Negativo	NR	Confirmación
68	H	80	-	Cuerdas tendinosas	No se detecta	NR	NI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NR	Resolución
69	H	78	-	Tejido válvula aórtica	No se detecta	NR	No leucocitos/No microorganismos	<i>Staphylococcus hominis</i>	NR	Resolución

Abreviaturas: M= Mujer; H= Hombre; CGP=Cocos Gram positivos; NI=No informado; NR= No realizado