

Etiologie emergenti responsabili di endocarditi infettive con emocolture negative

Francesco Enia, Gianfranco Di Stefano, Agata Marina Floresta, Concetta Matassa

U.O. di Cardiologia II, Centro di Riferimento Regionale per l'Epidemiologia Clinica dell'Insufficienza Cardiaca, Azienda Ospedaliera V. Cervello, Palermo

Key words:
Endocarditis;
Infective endocarditis.

The prevalence of infective endocarditis with negative blood cultures varies in the different series from 5 to 25%. There are certain explanations of negative blood culture endocarditis: previous incorrect antibiotic therapy before obtaining blood samples (antibiotic treatment inhibits the growth of germs, and therefore bacteremia, without sterilizing the vegetations); infective endocarditis due to fastidious microorganism, that is of difficult cultivation and identification; infective endocarditis due to cell-dependent organism (e.g. *Coxiella burnetii*); infective endocarditis due to fungi; non-infectious involvement of the endocardium (at times with vegetations) during the course of certain disease.

We underline three etiologies (*Coxiella burnetii*, *Bartonella species* and Whipple's disease bacterium) because their study have constituted the stimulus for the introduction into clinical evaluation of patients with suspected infective endocarditis of different diagnostic approaches, based on a correct sequential application of blood cultures, serodiagnosis and molecular microbiology.

(Ital Heart J Suppl 2005; 6 (3): 128-134)

© 2005 CEPI Srl

Ricevuto il 3 novembre 2004; nuova stesura l'11 gennaio 2005; accettato il 17 febbraio 2005.

Per la corrispondenza:

Dr. Francesco Enia

Via F. Liszt, 47
90145 Palermo
E-mail: fenia@tin.it

Si parla di endocardite infettiva (EI) con emocolture negative quando, in presenza di un quadro clinico con alta probabilità di EI, le emocolture risultino costantemente negative¹. La prevalenza varia nelle diverse casistiche dal 5 al 25%²⁻⁸. Il problema è reso complesso dalla mancanza di dati omogenei: i campioni infatti possono essere trattati in modo diverso nei vari laboratori^{9,10}.

Vi sono alcune spiegazioni per le EI con emocolture negative:

- una terapia antibiotica (in genere impropria) prima di ottenere i campioni di sangue^{2,11-13}. In uno studio francese osservazionale, durato 1 anno, le emocolture negative costituivano il 14% (88 su 620 casi) di EI documentata¹⁴. In 42 di questi 88 casi le emocolture negative erano associate a somministrazione di antibiotici prima del prelievo.

La terapia antibiotica inibisce lo sviluppo del germe e quindi la batteriemia, senza sterilizzare le vegetazioni^{15,16}. La sensibilità del germe all'antibiotico somministrato e la durata della terapia sono i principali fattori che determinano la persistenza della negatività delle emocolture dopo la sospensione dell'antibiotico¹. Si può tentare di neutralizzare l'antibiotico o diminuirne gli effetti diluendo nel terreno di coltura il sangue prelevato (almeno

1:10) e aggiungendo penicillinasi (per rimuovere gli antibiotici beta-lattamici) o altre speciali resine assorbenti^{1,9}, ma con risultati non soddisfacenti;

- presenza di microrganismi "fastidious" cioè di difficile coltura e di difficile identificazione, come le varianti nutrizionali degli streptococchi, gli HACEK (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*), i germi anaerobi obbligati, ecc. In questi casi può essere necessario ricorrere a particolari terreni di coltura o a prolungati periodi di incubazione¹⁷⁻²⁰;

- presenza di organismi "cell-dependant" (per esempio la *Coxiella burnetii*)¹. La coltura tessutale è l'unico sistema per isolare microrganismi patogeni intracellulari obbligati;

- endocarditi da funghi, che devono sempre essere sospettate in caso di EI con emocolture negative e inefficacia della terapia antibiotica empirica. Le emocolture sono negative in un quinto di pazienti con EI da *Candida* e in tutti i pazienti con EI da *Aspergillus*²¹;

- coinvolgimento non infettivo dell'endocardio (talora con vegetazioni) nel corso di alcune malattie autoimmuni, endomiocardiofibrosi, sarcoidosi, linfomi, ecc.

I pazienti con EI ed emocolture negative presentano (rispetto ai pazienti con EI ed emocolture positive) una maggiore morta-

lità e una maggiore morbilità^{2-5,7}, che possono essere spiegate, almeno in parte, con il ritardo diagnostico e con il successivo ritardo di una terapia razionale. Zamorano et al.²², in una casistica retrospettiva di 107 pazienti con EI, hanno identificato due sottogruppi. Il primo, costituito da pazienti con emocolture negative e precedente terapia antibiotica, è stato definito “EI con emocolture abortite”; il secondo, comprendente pazienti con EI da germi “fastidious”, “cell-dependent”, ecc., è stato definito “EI con vere emocolture negative”. Ovviamente il termine “vero negativo” può risultare equivoco, infatti la maggior parte di queste endocarditi è dovuta a una “vera infezione” in cui è difficile o impossibile isolare il germe nel sangue. La prognosi è peggiore nel sottogruppo dei pazienti con “vere emocolture negative”, senza precedente terapia antibiotica, con significativo incremento di endpoint negativi combinati (mortalità e necessità di intervento chirurgico) (100 vs 64%)²².

Una tappa importante nello studio delle EI con emocolture negative è costituita dall’applicazione delle tecniche di microbiologia molecolare, che hanno migliorato la capacità di identificare etiologie insolite e che stanno diventando sempre più di routine nei laboratori di microbiologia²³.

La reazione polimerasica a catena (PCR), applicata in lesioni cutanee nel corso di angiomatosi bacillare per identificare la *Bartonella*²⁴ e nelle biopsie dell’intestino tenute per il batterio della malattia di Whipple²⁵, ha permesso successivamente, applicata su valvole cardiache escisse, la diagnosi di EI dovute a questi germi²⁶⁻²⁸.

I passaggi della microbiologia molecolare sono i seguenti:

- prelievo del materiale adeguato (soprattutto vegetazioni di valvole escisse o emboli). Recentemente Millar et al.²⁹ hanno usato con successo la tecnica anche sulle emocolture, più facilmente disponibili rispetto alle valvole escisse. La microbiologia molecolare applicata alle emocolture permette ovviamente un’identificazione più precoce del germe nelle EI con emocolture negative e quindi l’inizio più rapido di una terapia razionale;
- lisi enzimatica di tutte le cellule (con lisozima e proteinasi) per estrarre il DNA;
- marcatura con primer di una porzione del genoma batterico da identificare, specifica e universale per i batteri, sulla quale successivamente operare il riconoscimento del ceppo. Loci universali per i batteri sono i geni per il 16S rRNA ribosomiale (per i funghi si ricercano i geni per il 18S, 28S e 5.8S rRNA). In casi difficili si può ampliare la zona del genoma per il 16S rRNA da saggiare o eseguire una sequenza per altri loci specifici;
- amplificazione del materiale genetico con la PCR;
- sequenziamento dei geni amplificati, cioè lettura base per base del frammento identificato;
- confronto della sequenza dei nucleotidi, ottenuta “leggendo” il frammento in esame, con le sequenze note conservate in una banca dati (Genbank, per esempio),

che contiene i genomi di numerosi batteri. In tal modo è possibile identificare correttamente il germe.

Tra i problemi legati a queste tecnologie, sono da segnalare il blocco della PCR che talora avviene per cause non chiare, con diminuzione della sensibilità, e il rischio di contaminazione (probabilmente per test precedenti) che può influire sulla specificità¹⁹. In caso di dubbio quindi la ricerca di un secondo target può confermare i risultati della PCR per il 16S rRNA e ridurre l’incidenza di falsi positivi³⁰.

Queste tecniche, indipendenti dalle colture, permettono l’identificazione di quasi tutti i batteri con una singola ricerca¹. Goldenberger et al.³¹, che hanno amplificato il DNA batterico in 15 valvole escisse su 18 (in 2 casi non è stato identificato alcun DNA batterico e in 1 caso la PCR è stata inibita), considerano la tecnica relativamente facile e affidabile.

Con la microbiologia molecolare Millar et al.²⁹ hanno potuto confermare, nelle emocolture (47 pazienti) e nelle valvole escisse (30 pazienti), tutti i casi di EI “sicura” e tutte le esclusioni cliniche di EI (con l’eccezione di 1 paziente con un’altra fonte di batteriemia e 5 pazienti il cui materiale ematico è stato verosimilmente contaminato). Il dato più interessante comunque è che 6 pazienti con emocoltura negativa considerati con EI “possibile” sono passati nel gruppo con EI “sicura” inserendo il dato molecolare tra i criteri della Duke University.

Le tecnologie di amplificazione del DNA permettono anche di evidenziare la presenza di geni responsabili di antibiotico-resistenza. In pazienti con EI, Moore et al.³² hanno potuto evidenziare in modo rapido, con la PCR su emocolture e valvole escisse, loci per la resistenza ai comuni antibiotici in stafilococchi (*mecA*, *aacA-aphD*), streptococchi (*PBP 1A*, *PBP 2B*, *gyrB*) ed enterococchi (*van A*, *van B*, *van C-1*, *van C-2*, *aacA-aphD*, *aphA3*).

Per quanto concerne le “EI con vere emocolture negative” è interessante soffermarsi su tre etiologie: *Coxiella burnetii*, *Bartonella spp* e batterio della malattia di Whipple.

Endocardite infettiva da *Coxiella burnetii*

La *Coxiella burnetii*, responsabile della febbre Q (zoonosi ubiquitaria), è un patogeno intracellulare obbligato che si moltiplica nei fagolisosomi delle cellule infette¹. Può contagiare l’uomo attraverso l’inalazione di polveri contaminate che possono provenire anche da notevole distanza, data la notevole resistenza agli agenti fisici della *Coxiella burnetii*, che può sopravvivere a lungo nell’ambiente³³. Gli animali portatori di *Coxiella burnetii* sono in genere quelli delle fattorie (bovini e pecore); cani e gatti sono stati ritenuti responsabili di alcuni casi urbani della malattia³⁴. In Francia, nell’80% dei pazienti con EI da *Coxiella burnetii*, è identificabile un fattore di rischio, cioè il contatto con animali, in genere pecore; nel 9.6% di pazienti l’infezione si mani-

febbre dopo il consumo di latte non bollito³⁵. Poiché solo il 30% di EI si manifesta in pazienti che vivono in aree rurali, è verosimile che nella maggior parte dei casi l'infezione possa essere stata contratta dopo fugaci esposizioni (visita in una fattoria, gita in campagna, ecc.)³⁵.

La febbre Q si manifesta in forma acuta e cronica³⁶. L'EI con emocolture negative costituisce il 78% delle forme croniche³⁷ e il 3-5% di tutti i casi di EI in Francia, Israele e Inghilterra^{1,38}. Due terzi dei pazienti sono maschi di età compresa tra 60 e 69 anni³³. Nel 90% dei casi vi è una cardiopatia preesistente³³. La valvola aortica e la mitrale sono coinvolte in eguale misura ed è frequente l'interessamento di protesi valvolari (55% dei casi). La presenza di vegetazioni è rara. Il quadro clinico è caratterizzato in genere da febbre (68% dei casi) e da manifestazioni di scompenso cardiaco (67% dei casi)³³.

La *Coxiella burnetii* può essere isolata soltanto nelle colture cellulari, provenienti da vegetazioni, con l'immunoistochimica, che ne mostra la presenza nei macrofagi^{39,40}. Poiché queste tecniche devono essere limitate soltanto a quei laboratori che adottino peculiari misure di sicurezza nell'isolamento di patogeni pericolosi, è molto più semplice per la diagnosi utilizzare test sierologici, per i quali è sufficiente un singolo campione di siero. La tecnica di riferimento per evidenziare gli anticorpi contro gli antigeni di fase 1 e di fase 2 è l'immunofluorescenza, che permette di titolare gli anticorpi immunoglobuline (Ig) M, IgG e IgA: un titolo anticorpale IgG contro l'antigene di fase 1 ≥ 800 associato a un titolo anticorpale IgA ≥ 100 è altamente predittivo³³. La *Coxiella burnetii* può essere identificata anche con l'amplificazione mediante PCR⁴¹.

Poiché nei pazienti con quadro clinico ad alta probabilità di EI ma con emocolture negative, un alto titolo anticorpale contro antigeni di fase 1 è da considerare diagnostico per EI da *Coxiella*, è stato proposto di inserire questo dato tra i criteri maggiori della Duke University per la diagnosi di EI⁴².

La terapia raccomandata è l'associazione di tetraciclina con un fluorochinolone per almeno 3 anni⁴³. Le non rare recidive sono correlate all'azione esclusivamente batteriostatica di questi antibiotici⁴³. Può essere più efficace l'associazione, per almeno 18 mesi, di doxiciclina (200 mg/die) con idrossiclorochina (200 mg 3 volte/die), un agente alcalinizzante usato nella terapia contro la malaria, che ripristina l'attività battericida della doxiciclina⁴⁴.

Endocardite infettiva da *Bartonella* spp

I germi della *Bartonella* spp sono piccoli batteri ubiquitari gram-negativi intracellulari facoltativi¹. Causano svariate sindromi cliniche in pazienti immunodepressi (malattia da graffio di gatto, meningoencefaliti ed endocarditi)⁴⁵⁻⁴⁷ e prolungate febbri in pazienti non

immunodepressi (la febbre delle trincee)¹; in pazienti HIV positivi possono causare angiomasiosi bacillare ed epatiti^{24,48}.

Tra le varie specie di *Bartonella*, la *Bartonella henselae* e la *quintana* causano la maggior parte di EI¹. In uno studio multicentrico nella prima metà degli anni '90, prevalentemente retrospettivo, eseguito su campioni ematici e materiale chirurgico proveniente da pazienti con EI ed emocolture negative, Raoult et al.¹⁹ hanno identificato 22 casi di EI da *Bartonella* grazie alla determinazione del titolo anticorpale o all'identificazione del genoma batterico: 5 da *Bartonella quintana*, 4 da *Bartonella henselae* e 13 da altre specie. Prima di questo lavoro erano stati descritti soltanto 11 casi.

Nel 2001 Brouqui e Raoult¹ hanno considerato l'incidenza di EI da *Bartonella* paragonabile a quella dell'EI da *Coxiella burnetii*, cioè il 3% dei casi.

Alcuni dati epidemiologici aiutano a distinguere le due principali etiologie: 1) l'EI da *Bartonella henselae* si manifesta nell'87% dei casi in pazienti con preesistenti valvulopatie; il germe è trasmesso all'uomo da un morso o graffio di gatto o dalle pulci; 2) solo il 30% di pazienti con EI da *Bartonella quintana* ha una valvulopatia preesistente; il germe, trasmesso all'uomo dal pidocchio, è oggi l'agente etiologico più frequente di EI in un gruppo peculiare di soggetti a rischio, i vagabondi, con alta incidenza di infestazione da pidocchi, favorita dall'alcolismo e dalla malnutrizione. La mortalità più alta tra pazienti con EI da *Bartonella quintana* è probabilmente dovuta alla ritardata ospedalizzazione dei vagabondi, con conseguente ritardo diagnostico e terapeutico.

I pazienti con EI da *Bartonella* sono più giovani rispetto ai pazienti con EI da altre etiologie; sono più frequentemente maschi e più frequentemente necessitano dell'intervento chirurgico¹⁹.

La *Bartonella* causa un'EI subacuta, insidiosa, con molti sintomi aspecifici ma con significativa distruzione valvolare, soprattutto della valvola aortica¹.

È difficile isolare la *Bartonella* dal sangue¹⁹. Il microrganismo cresce molto lentamente (mesi), soltanto su speciali terreni di coltura non usati di routine nella maggior parte dei laboratori. Per evitare un rischioso ritardo diagnostico è opportuno sospettare l'infezione da *Bartonella* in tutti i pazienti con EI ed emocolture negative e applicare tecniche diagnostiche *ad hoc*¹. Nello studio di Raoult et al.¹⁹ i migliori risultati si ottengono con i test sierologici e con la PCR sulle valvole escisse.

I test sierologici sono eseguiti mediante immunofluorescenza¹⁹: un titolo di 1:100 indica un'infezione da *Bartonella*; un titolo di 1:1600 ha un alto valore predittivo positivo per EI (> 88%). Raoult et al.¹⁹ propongono di inserire il risultato positivo del test sierologico per la *Bartonella* tra i criteri minori della Duke University per la diagnosi di EI.

Poiché possono esservi reazioni crociate con la *Coxiella burnetii*⁴⁹ e con la *Chlamydia pneumoniae*⁵⁰ e poiché in alcuni casi non c'è alcuna reazione anticor-

pale¹⁹, i test sierologici da soli possono non essere sufficienti per la diagnosi, soprattutto nei pazienti immunodepressi. Anche in questo caso possono essere utili le tecniche di microbiologia molecolare, cioè l'amplificazione con PCR di frammenti del DNA della *Bartonella* da valvole infette. Raoult et al.¹⁹ sono riusciti a ottenere risultati positivi in 8 tentativi su 10.

La *Bartonella* è molto sensibile alle penicilline ad ampio spettro, aminoglicosidi, macrolidi, tetracicline e rifampicina¹, ed è meno sensibile alle penicilline a spettro ristretto e alla clindamicina⁴⁹. La sensibilità ai fluorochinoloni è variabile⁵¹.

Benché non vi sia un protocollo codificato, basandosi sui dati clinici e sull'attività antimicrobica *in vitro*, Brouqui e Raoult¹ suggeriscono l'associazione di un aminoglicoside con la doxiciclina o con il ceftriaxone per un lungo periodo di tempo. La chirurgia, per l'esteso danno valvolare, è necessaria nell'80% dei casi¹.

Endocardite infettiva da batterio della malattia di Whipple

Il batterio della malattia di Whipple è un gram-positivo, responsabile della malattia, rara ma ubiquitaria, descritta da Whipple nel 1907, per molto tempo considerata peculiare del tratto gastrointestinale; in realtà le manifestazioni cliniche sono sistemiche e aspecifiche⁵².

Il batterio, identificato soltanto nel 1961 con la microscopia elettronica⁵³, presenta un caratteristico aspetto trilamellare: la membrana plasmatica è circondata da una parete sottile, non omogenea, a sua volta circondata da un'altra struttura simile a una membrana plasmatica. Nel 1991 Wilson et al.²⁵ hanno sequenziato il gene per il 16S rRNA di questo nuovo batterio, identificandone la posizione filogenetica e chiamandolo *Tropheryma whippelii*, per riconoscere il contributo di Whipple all'identificazione della malattia. Questa tassonomia non è più accettata. Ulteriori studi con la microbiologia molecolare infatti hanno permesso di classificare il batterio come un gram-positivo appartenente al gruppo degli *Actinomycetes*⁵². Lo studio con PCR ha mostrato una diffusa presenza di questo batterio tra le persone sane e nell'ambiente di alcune aree geografiche^{52,54}. Maiwald et al.⁵⁴ hanno potuto isolarlo con la PCR in alcuni campioni di acqua. Probabilmente la sperequazione tra diffusa presenza del germe e rarità della malattia può essere spiegata con la necessità di associati fattori di rischio sconosciuti o di una peculiare suscettibilità genetica.

Il batterio della malattia di Whipple è presente dentro molte cellule: macrofagi, cellule intestinali, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, leucociti polimorfonucleati, plasmacellule e linfociti⁵².

Probabilmente l'infezione avviene per via orale. La malattia è caratterizzata da un periodo prodromico (con poliartrite, astenia, perdita di peso, anemia), seguito da una sindrome con dolore addominale, diarrea e severa

cachessia. Spesso sono presenti linfadenopatie e iperpigmentazione cutanea⁵². È frequente il coinvolgimento del sistema nervoso centrale (demenza progressiva e sintomi cerebellari). Possono essere interessati i polmoni (versamento pleurico) e gli occhi (uveite, retinite, cherarite). Il decorso è cronico con un lento deterioramento, recidive e ricoveri sempre più frequenti.

Il sospetto clinico è confermato dalla biopsia della mucosa duodenale, che mostra, nella lamina propria, la presenza di macrofagi "foamy", caratteristici della malattia di Whipple⁵², con granuli intracitoplasmatici positivi alla reazione all'acido periodico di Schiff, ripieni di mucopolisaccaridi e glicoproteine. Questi granuli sono batteri intatti o parzialmente degenerati.

Il coinvolgimento cardiaco, riportato nel 20-55% dei pazienti, è multiforme: endocardite, pericardite costrittiva, miocardite, arterite coronarica, scompenso e morte improvvisa^{55,56}. L'endocardite con emocolture negative è la manifestazione più frequente⁵⁷.

In una rassegna della letteratura, sono riportati 35 pazienti con EI⁵⁸, di questi 31 (89%) erano maschi, con età compresa tra 33 e 66 anni (media 49 anni). Vi possono essere due diverse presentazioni cliniche: una nella quale il coinvolgimento valvolare è parte di una malattia generalizzata e l'altra nella quale il coinvolgimento cardiaco è il dato dominante (soprattutto lo scompenso), in assenza di sintomi sistemici. La febbre è presente solo in un terzo dei casi. Una cardiopatia preesistente si trova solo nel 12% dei pazienti. Tutte le valvole possono essere coinvolte. L'ecocardiografia mostra vegetazioni nel 75% dei casi.

Nel 2000 Raoult et al.⁵⁹ hanno isolato con successo il batterio della malattia di Whipple in una valvola di paziente con EI ed emocolture negative. Gubler et al.⁶⁰ hanno descritto altri 4 casi di EI in pazienti con artralgie e scompenso cardiaco ma senza febbre e senza particolare coinvolgimento intestinale. In 3 pazienti vi erano vegetazioni ecocardiografiche. Le emocolture e gli esami sierologici erano negativi. Senza l'identificazione del genoma batterico con la PCR sulle valvole escisse, i 4 pazienti sarebbero stati considerati "senza EI" secondo i criteri della Duke University prima della conferma chirurgica e molecolare.

I tentativi di coltivare il batterio della malattia di Whipple non hanno avuto successo sino al 2000, quando Raoult et al.⁵⁹ hanno dimostrato per primi che la coltura è possibile usando linee cellulari di fibroblasti umani (HEL e MRC5), in un medium peculiare. Al microscopio si può rilevare un effetto citopatico dopo almeno 6 settimane, con le caratteristiche piccole inclusioni scure e grossolane⁵⁹. Il batterio coltivato può anche essere identificato con la PCR e il sequenziamento del 16S rRNA ed eventualmente di parte del 23S rRNA⁶¹.

Le valvole escisse e le biopsie duodenali possono dunque essere direttamente inoculate in specifici terreni di coltura o sottoposte all'amplificazione con la PCR del genoma batterico^{52,62-64}. L'amplificazione con PCR, sensibile e specifica, facilita la diagnosi e il monitoraggio

gio della malattia; può essere condotta su campioni biotici tessutali, su liquidi aspirati (succo gastrico, liquor cerebrospinale, versamento pleurico, ecc.) o sul sangue periferico⁶⁵⁻⁶⁷.

La malattia ha un'alta mortalità (57%), ma questo dato può essere influenzato dal fatto che molte diagnosi sono state fatte dopo l'esame autoptico⁵⁸.

La terapia ottimale non è ancora ben definita. Bisogna adoperare antibiotici che passino la barriera ematoencefalica, infatti i microrganismi sequestrati nel sistema nervoso centrale possono essere causa di recidive⁶⁸. La terapia raccomandata è la somministrazione quotidiana parenterale di streptomina (1 g) e benzilpenicillina (1.2 milioni di unità) per 14 giorni, seguita dal trimetoprim/sulfametossazolo (160 mg/800 mg 2 volte/die *per os*) per 1 anno (o 2 se vi è coinvolgimento del sistema immunitario)^{57,68}. Dykman et al.⁶⁹, ipotizzando che questi farmaci esercitino soltanto un'azione batteriostatica, suggeriscono di aggiungere un farmaco battericida come il ceftriaxone.

In conclusione perché queste segnalazioni non sono uno sterile esercizio di erudizione ma rivestono un certo interesse clinico?

- Perché alcune delle emocolture negative nei pazienti con EI sono causate da questi germi.
- Perché grazie alle tecniche di microbiologia molecolare è stato possibile ampliare lo spettro dei batteri coinvolti nell'etiologia delle EI (*Bartonella quintana*, batterio della malattia di Whipple, ecc.).
- Perché è probabile che si tratti di etiologie finora sottostimate. Per esempio, i 4 casi di EI da batterio della malattia di Whipple descritti da Gubler et al.⁶⁰ nel 1999, in una piccola zona della Svizzera, in un periodo di 3 anni, possono significare o un'alta prevalenza della malattia in quella zona o una migliore identificazione di un fenomeno rilevato con metodiche appropriate.
- Perché le EI con emocolture negative hanno costituito lo stimolo per l'introduzione nella valutazione clinica di questi pazienti di approcci diagnostici diversi. Brouqui e Raoult¹ sostengono che, con un'articolazione razionale della diagnostica (emocolture, sierodiagnosi e microbiologia molecolare), si possa arrivare all'identificazione etiologica delle EI nella quasi totalità dei casi. Questi autori, che hanno la maggior esperienza in questo campo, in caso di EI con emocolture negative, propongono una determinazione sistematica del titolo anticorpale contro *Coxiella burnetii*, *Bartonella spp*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophyla*, *Chlamydia* e *Brucella melitensis*¹.

In base a questi dati, il gruppo di Raoult^{19,29,42} ha proposto di ampliare i criteri della Duke University per la diagnosi di EI inserendo:

- la sierodiagnosi per la *Coxiella burnetii* tra i criteri maggiori⁴²; il suggerimento è stato raccolto da Li et al.⁷⁰ e confermato nella rassegna sulle EI di Mylonakis e Calderwood⁷¹;
- il risultato positivo del test sierologico per la *Bartonella* tra i criteri minori¹⁹;

- i dati molecolari, limitandone l'uso soltanto alle EI con emocolture negative²⁹.

Riassunto

La prevalenza delle endocarditi infettive con emocolture negative oscilla, nelle varie casistiche, tra 5 e 25%. Vi sono alcune spiegazioni di questa negatività: terapia antibiotica, spesso impropria, prima di ottenere i campioni di sangue (l'antibiotico inibisce lo sviluppo del germe, quindi la batteriemia, senza sterilizzare le vegetazioni); endocarditi da germi "fastidious", cioè di difficile coltura e di difficile identificazione; endocarditi dovute a patogeni intracellulari obbligati (per esempio la *Coxiella burnetii*); endocarditi da funghi; coinvolgimento non infettivo dell'endocardio (talora con vegetazioni).

Analizziamo tre etiologie di endocarditi con emocolture negative (*Coxiella burnetii*, *Bartonella spp* e batterio della malattia di Whipple) che hanno costituito lo stimolo per un'articolazione più razionale della diagnosi, nei pazienti con sospetta endocardite, associando alle classiche emocolture anche le sierodiagnosi e la microbiologia molecolare.

Parole chiave: Endocardite; Endocardite infettiva.

Bibliografia

1. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 177-207.
2. Pesanti EL, Smith IM. Infective endocarditis with negative blood cultures. An analysis of 52 cases. Am J Med 1979; 66: 43-50.
3. Van Scoy RE. Culture-negative endocarditis. Mayo Clin Proc 1982; 57: 149-54.
4. Tunkel AR, Kaye D. Endocarditis with negative blood cultures. N Engl J Med 1992; 326: 1215-7.
5. Ali AS, Trivedi V, Lesch M. Culture-negative endocarditis. A historical review and 1990s update. Prog Cardiovasc Dis 1994; 3: 149-60.
6. Oakley CM. The medical treatment of culture-negative infective endocarditis. Eur Heart J 1995; 16 (Suppl B): 90-3.
7. Barnes PD, Crook DW. Culture negative endocarditis. J Infect 1997; 35: 209-13.
8. Millar BC, Altwegg M, Raoult D, Moore JE. Culture negative endocarditis. Causes, diagnosis and treatment. Reviews in Medical Microbiology 2000; 11: 59-65.
9. Washington JA. Collection, transport and processing of blood cultures. Clin Lab Med 1994; 14: 59-69.
10. Wilson ML, Weinstein MP. General principles in the laboratory detection of bacteremia and fungemia. Clin Lab Med 1994; 14: 69-78.
11. Hampton JR, Harrison MJ. Sterile blood cultures in bacterial endocarditis. Q J Med 1967; 36: 167-74.
12. Werner AS, Cobbs GC, Kaye D, Hook EW. Studies on the bacteremia of bacterial endocarditis. JAMA 1967; 282: 199-203.
13. Pazin GJ, Saul S, Thompson ME. Blood cultures positivity: suppression by outpatient antibiotic therapy in patients with bacterial endocarditis. Arch Inter Med 1982; 142: 263-8.

14. Hoen B, Selton-Suty C, Lacassin F, et al. Infective endocarditis in patients with negative blood cultures: analysis of 88 cases from a one-year nationwide survey in France. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 501-6.
15. Delahaye F, Rial MO, De Genigny G, et al. A critical appraisal of the quality of the management of infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 788-93.
16. Muhlestein JB. Infective endocarditis: how well are we managing our patients? *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 794-5.
17. Roberts RB, Krieger AG, Schiller RN, Gross KG. Viridans streptococcal endocarditis: the role of various species including pyridoxal-dependent streptococci. *Rev Infect Dis* 1979; 1: 955-66.
18. Tierno PM Jr, Inglisma K, Parisi MT. Detection of *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae* bacteremia using BacT/Alert blood culture system. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 530-6.
19. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M, et al. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 646-52.
20. Bayer AS, Bolger AF, Taubert KA, et al. Diagnosis and management of infective endocarditis and its complications. *Circulation* 1999; 98: 2936-48.
21. Moyer DV, Edwards JE. Fungal endocarditis. In: Kaye D, ed. *Infective endocarditis*. New York, NY: Raven Press, 1992: 299-312.
22. Zamorano J, Sanz J, Almeria C, et al. Differences between endocarditis with true negative blood cultures and those with previous antibiotic treatment. *J Heart Valve Dis* 2003; 12: 256-60.
23. Fredericks AP, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 18-33.
24. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Thompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 1990; 323: 1573-80.
25. Wilson KH, Blitchington R, Frothingham R, Wilson JA. Phylogeny of the Whipple's-disease-associated bacterium. *Lancet* 1991; 338: 474-5.
26. Drancourt M, Mainardi JL, Brouqui P, et al. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* endocarditis in three homeless men. *N Engl J Med* 1995; 332: 419-23.
27. Wendler D, Mendoza E, Schleiffer T, Zander M, Maier M. *Tropheryma whippelii* endocarditis confirmed by polymerase chain reaction. *Eur Heart J* 1995; 16: 424-5.
28. Jalava J, Kotilainen P, Nokkari S, et al. Use of polymerase chain reaction and DNA sequencing for detection of *Bartonella quintana* in the aortic valve of a patient with culture negative infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 891-6.
29. Millar B, Moore J, Mallon P, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis. A new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 673-80.
30. Qin X, Urdahl KB. PCR and sequencing of independent genetic targets for the diagnosis of culture negative bacterial endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40: 145-9.
31. 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: 2733-9.
32. Moore JE, Millar BJ, Yongmin X, et al. A rapid molecular assay for the detection of antibiotic resistance determinants in causal agents of infective endocarditis. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 719-26.
33. Stein A, Raoult D. Q fever endocarditis. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl B): 19-23.
34. Marrie TJ, Durant H, Williams CJ, Mintz E, Waag M. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *J Infect Dis* 1988; 158: 101-8.
35. Brouqui P, Tissot-Dupont H, Drancourt M, et al. Chronic Q fever: ninety-two cases from France including 27 without endocarditis. *Arch Intern Med* 1993; 153: 642-4.
36. Raoult D, Marrie T. Q fever. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 489-96.
37. Marrie TJ. A comparison of Q fever endocarditis with native valve endocarditis. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 590: 61-7.
38. Palmer SR, Young SE. Q-fever endocarditis in England and Wales, 1975-1981. *Lancet* 1982; 2: 1448-9.
39. Raoult D, Vestris G, Enea M. Isolations of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2482-4.
40. Brouqui P, Dumler JS, Raoult D. Immunohistologic demonstration of *Coxiella burnetii* in the valves of patients with Q fever endocarditis. *Am J Med* 1994; 97: 451-8.
41. Stein A, Raoult D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2462-6.
42. Fournier PE, Casalta JP, Habib J, Messana T, Raoult D. Modifications of the diagnostic criteria proposed by the Duke Endocarditis Service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis. *Am J Med* 1996; 100: 629-33.
43. Levy P, Drancourt M, Etienne J, et al. Comparison of different antibiotic regimens for therapy of 32 cases of Q fever endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 533-7.
44. Raoult D, Houpijian P, Tissot Dupont H, Riss JM, Arditi-Djiane J, Brouqui P. Treatment of Q fever endocarditis: comparison of 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Intern Med* 1999; 159: 167-73.
45. Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, Bibb W. Serological response to *Rochalimaea henselae* antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 1992; 339: 1443-5.
46. Wong MT, Dolan MJ, Lattuada CP Jr, et al. Neuroretinitis, aseptic meningitis, and lymphadenitis associated with *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae* infection in immunocompetent patients and patients infected with human immunodeficiency virus type I. *Clin Infect Dis* 1996; 21: 352-60.
47. Hadfield TL, Warren R, Kass M, Brun E, Levy C. Endocarditis caused by *Rochalimaea henselae*. *Hum Pathol* 1993; 24: 1140-1.
48. Koehler JE, Tappero JW. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 612-24.
49. La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2270-4.
50. Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2283-7.
51. Maurin M, Gasquet S, Ducco C, Raoult D. MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2383-7.
52. Fenollar F, Raoult D. Whipple's disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 1-8.
53. Cheers WC Jr, Ashworth CT. Electron microscopic study of the intestinal mucosa in Whipple's disease: demonstration of encapsulated bacilliform bodies in the lesion. *Gastroenterology* 1961; 41: 29-38.
54. Maiwald M, Schuhmacher F, Ditton HJ, von Herbay A. Environmental occurrence of the Whipple's disease bacterium (*Tropheryma whippelii*). *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 760-2.

55. James TN, Bulkley RH. Abnormalities of the coronary arteries in Whipple's disease. *Am Heart J* 1983; 105: 481-91.
56. Khairy P, Graham AF. Whipple's disease and the heart. *Can J Cardiol* 1996; 12: 831-4.
57. Durand DV, Lecomte C, Cathebras P, Rousset H, Godeau P. Whipple disease. Clinical review of 52 cases. The SNFMI Research Group on Whipple Disease. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76: 170-84.
58. Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Whipple's endocarditis. Review of the literature and comparison with Q fever, Bartonella infection, and blood culture-positive endocarditis. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1309-16.
59. Raoult D, Birg ML, La Scola B, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 620-5.
60. Gubler JG, Kuster M, Dutly F, et al. Whipple endocarditis without overt gastrointestinal disease: report of four cases. *Ann Intern Med* 1999; 131: 112-6.
61. 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: 595-9.
62. Raoult D. Afebrile negative blood cultures endocarditis. *Ann Intern Med* 1999; 131: 144-6.
63. Maiwald M, von Herbay A, Lepp PW, Relman DA. Organization, structure, and variability of the rRNA operon of the Whipple's disease bacterium (*Tropheryma whippelii*). *J Bacteriol* 2000; 182: 3292-7.
64. Hinrikson HP, Dutly F, Nair S, Altwegg M. Detection of three different types of *Tropheryma whippelii* directly from clinical specimens by sequencing single-strand conformation polymorphism analysis and type-specific PCR of their 16S-23S ribosomal intergenic spacer region. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49 (Part 4): 1701-6.
65. Lowsky R, Archer GL, Fyles G, et al. Brief report: diagnosis of Whipple's disease by molecular analysis of peripheral blood. *N Engl J Med* 1994; 331: 1343-6.
66. Pron B, Poyart C, Abachin E, et al. Diagnosis and follow-up of Whipple's disease by amplification of the 16S rRNA gene of *Tropheryma whippelii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 62-5.
67. Ramzan NN, Loftus EJ, Burgart LJ, et al. Diagnosis and monitoring of Whipple disease by polymerase chain reaction. *Ann Intern Med* 1997; 126: 520-7.
68. Singer R. Diagnosis and treatment of Whipple's disease. *Drugs* 1998; 55: 699-704.
69. Dykman D, Cuccherini BA, Fuss I, Blum L, Wouters S. Whipple disease in a father-daughter. *Dig Dis Sci* 2000; 44: 2542-4.
70. 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: 633-8.
71. Mylonakis E, Calderwood SB. Infective endocarditis in adults. *N Engl J Med* 2001; 345: 1318-30.