

증식편에서 16S rRNA 직접 염기서열분석으로 진단한 *Haemophilus parainfluenzae* 심내막염

Haemophilus parainfluenzae Infective Endocarditis Diagnosed by Direct 16S rRNA Sequencing of Vegetation

오성희¹ · 조민철¹ · 김재욱¹ · 안동희¹ · 정문희¹ · 김미나¹ · 최상호²

Sung-Hee Oh, M.D.¹, Min-Chul Cho, M.D.¹, Jae-Wook Kim, M.D.¹, Dongheui An, M.D.¹, Mun-Hui Jeong, M.D.¹, Mi-Na Kim, M.D.¹, Sang-Ho Choi, M.D.²

울산의대 서울아산병원 진단검사의학과¹, 감염내과²

Departments of Laboratory Medicine¹ and Internal Medicine², University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

The HACEK group of microorganisms is responsible for approximately 3-6% of endocarditis cases and is a major cause of culture-negative endocarditis. Here, we report a case of *Haemophilus parainfluenzae* infective endocarditis that was diagnosed by direct PCR sequencing of 16S rRNA from resected vegetation. A healthy 26-yr-old man was admitted to the emergency room (ER) on March 27, 2011 because of intermittent high fever. The patient was prescribed cefpodoxime for 5 days at the ER. Six and 11 sets of blood cultures were performed at the ER and in a general ward, respectively, using BACTEC Plus Aerobic/F (Becton-Dickinson, USA) and Lytic Anaerobic/F Plus (BD) together. Echocardiography revealed a large vegetation at the posterior mitral valve leaflet. After performing mitral valvoplasty on hospital day (HD) 11, the vegetation tissue was cultured in thioglycolate broth, blood agar, Brucella agar, and MacConkey agar for 7 days, but no organism was grown. Direct PCR sequencing of 16S rRNA of the tissue revealed the presence of *H. parainfluenzae*. In the 17 sets of blood cultures, bacterial growth was detected in only 2 aerobic bottles of 5 sets taken at HD 9 after 10-day and 14-day incubation. The organism was identified as *H. parainfluenzae* by using the VITEK NHI card (bioMérieux, France). Direct PCR sequencing of vegetation could be useful in diagnosing bacterial pathogens in infective endocarditis patients, especially in culture-negative cases.

Key Words: Endocarditis, PCR, Tissue, 16S rRNA, RNA sequence analysis

서 론

감염성 심내막염을 확진하는데 혈액배양에서 원인균을 검출하는 것은 매우 중요한 기준이다[1]. 하지만 혈액배양이 음성인 감염성 심내막염은 2.5-30%에 달한다[2]. 배양 음성 심내막염은 혈액배

양 전 항생제치료를 받은 후 원인균이 HACEK (*Haemophilus parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*) 균과 같이 배양하기 까다로운 균종일 경우 등이 주 원인이 된다[3]. 최근 배양 음성 심내막염의 경우 증식편에서 직접 진균이나 세균을 광범위하게 증폭한 후 염기서열을 분석하는 것이 원인균을 진단하는데 이용되고 있다[3]. 이 증례는 혈액배양에서 원인균 검출이 지연되어 심장판막 증식편으로부터 16S rRNA 직접 염기서열분석 한 후 *H. parainfluenzae*에 의한 심내막염을 진단할 수 있었기에 보고하고자 한다.

Corresponding author: Mi-Na Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center and University of Ulsan College of Medicine, 388-1 Pungnap-2dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel: +82-2-3010-4511, Fax: +82-2-478-0884, E-mail: mnkim@amc.seoul.kr

Received: September 5, 2011

Revision received: September 28, 2011

Accepted: September 28, 2011

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2012, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

증 례

2011년 3월 23일 평소 건강하였던 26세의 남자가 내원 1일 전부터 발생한 간헐적인 발열과 오한, 두통을 주소로 응급실에 내원하였다. 내원 당시 시행한 혈액검사에서 백혈구 $11.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ (호중구

87.7%), C-반응단백 15.78 mg/dL로 증가하였고, 총 빌리루빈 4.5 mg/dL, 직접 빌리루빈 0.6 mg/dL였으며 소변검사서 빌리루빈 1+, 잠혈반응 1+였다. 일시적인 세균 또는 바이러스 감염이 원인으로 추정되어 경구용 3세대 세팔로스포린 계열인 cefpodoxime 100 mg을 5일간 처방받은 후 퇴원하였다. 이후 계속되는 발열 및 오한으로 이틀 후 응급실에 다시 내원하였으며, 당시 이학적 검사에서 체온 38.7°C, 혈압 121/73 mmHg, 호흡수 20회/분, 맥박 103회/분이었고, 청진시 심잡음은 들리지 않았다. 혈액검사상 백혈구 $6.1 \times 10^3/\mu\text{L}$ (호중구 86.7%), 혈소판 $102 \times 10^3/\mu\text{L}$, 적혈구침강속도 62 mm/hr, C-반응단백 9.63 mg/dL, 총빌리루빈 2.4 mg/dL, 직접 빌리루빈 0.4 mg/dL이었다. 뇌척수액검사서 백혈구수는 $2/\mu\text{L}$ 로 정상이었다. 흉부 단순방사선 촬영 및 뇌 컴퓨터단층 촬영에서 다른 특이소견은 발견되지 않았다. 환자는 발열의 원인을 찾기 위하여 3월 27일 입원하였고, 3월 23일부터 27일까지 5일 동안 투여하던 cefpodoxime을 입원 2일째인 3월 28일부터 중단하였다.

응급실에서 시행한 3월 24일에 1쌍, 25일에 2쌍, 26일에 3쌍의 혈액배양과, 입원 2일 및 7일째 시행한 각각 3쌍의 혈액배양은 배양 5일까지 모두 음성이었다. 혈액배양은 BACTEC Plus Aerobic/F (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) 배지와 Lytic Anaerobic/F Plus 배지(BD)에 동시 접종하였고, BACTEC 9240 (BD)에 장착하여 배양하였다. 입원 9일째 시행한 경흉부심초음파에서 승모판 후방판막에 11×15 mm 크기의 증식물 및 컬러 도플러에서 승모판 역류가 관찰되었다. 다음날 경식도심초음파로 승모판 후방판막에서 11×18 mm 크기의 과운동성인 증식물을 확인하였다(Fig. 1). 입원 9일째 혈액배양 5쌍을 시행한 후, 느리게 자라는 까다로운 그람 음성균에 의한 감염성 심내막염을 의심하여 ceftriaxone 2,000 mg/day 정맥 내 주입 치료를 시작하였다. 입원 11일째 증식물을 제거하고 판막성형술을 시행하였다. 증식편은 혈액한천배지, Mac-

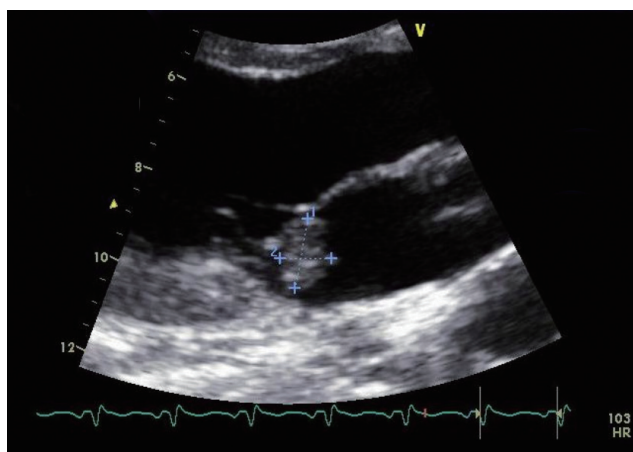


Fig. 1. Transthoracic echocardiography showed a huge, hypermobile vegetation (demarcated by 4 crosses) on a posterior leaflet of the mitral valve at hospital day 9.

Conkey 한천배지, 브루셀라 혈액한천배지, thioglycolate 액체배지에 배양하였으나 배양 7일째까지 균은 자라지 않았다. 배양 후 남은 조직에서 QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였고, 16S rRNA의 30-1,370번째 염기부위를 중합효소연쇄반응으로 증폭한 후 직접 염기서열분석을 시행하였다. 1,327 bp 크기의 염기서열을 GenBank에서 BLAST를 통해 검색한 결과, *H. parainfluenzae* (GenBank Accession No. EU083530.1)와 1,324/1,327 (99.8%)의 일치도를 보였다. 차순위 일치도를 보인 *H. paraphrophilus*와 1,300/1,327 (97.9%)의 상동성을 보여 *H. parainfluenzae*로 동정할 수 있었다. 입원 9일째 시행한 혈액배양 중 호기성 2병에서 배양 10일, 14일째 그람 음성 간균이 자랐고, VITEK NHI card (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)로 *H. parainfluenzae*를 동정하였다(bionumber 245700, 92%). 이 균은 β -lactamase는 음성이었고, Haemophilus Test Medium 배지를 이용한 디스크 확산법에서 ampicillin, amoxicillin/clavulanate, azithromycin, cefuroxime, ceftriaxone, trimethoprim/sulfamethoxazole, meropenem에 감수성을 보였다. 혈액배양검사는 접종 후 10일째 양성신호가 감지되고 동정 및 감수성 검사결과 보고까지 12일이 소요된 반면, 조직편을 직접 염기서열분석하는 방법으로 4일 만에 원인균을 동정할 수 있었다. 수술을 받은 후 1일째, 자극에 대한 반응이 느려지고 질문을 반복적으로 해야 대답하는 등 환자의 의식수준이 떨어져서 뇌 자기공명영상 검사를 시행하였고 양쪽 전두엽에서 다병소의 급성 피질 및 피질하 경색이 관찰되었다(Fig.

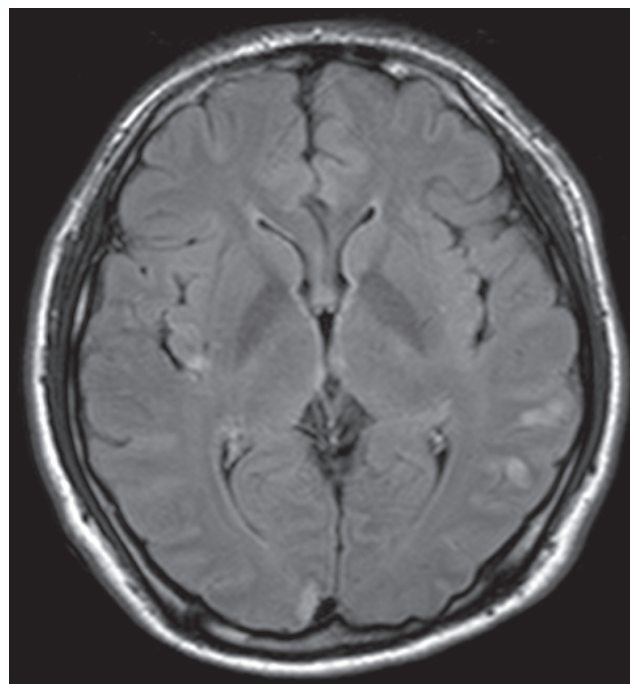


Fig. 2. Multifocal acute cortical and subcortical infarcts in both cerebral hemispheres on brain MRI at hospital day 12.

2). 환자는 4주간의 ceftriaxone 2,000 mg/day로 정맥 내 주입 치료를 받은 다음 회복되어 퇴원하였다.

고 찰

이 증례는 17쌍의 혈액배양 중 2쌍의 호기성 배양에서만 *H. parainfluenzae*가 분리되었고, 항생제 투여 중단 8일째 시행한 혈액배양에서 10일만에 첫 양성신호가 감지되었다. 동정 및 항균제 감수성 결과 보고까지 총 12일이 소요되었다. HACEK군은 구강 상재균에 속하며[4] 전체 심내막염의 원인 중 3-6%를 차지한다[5]. *Haemophilus* 종으로는 *H. parainfluenzae*와 *H. aphrophilus*가 원인균의 대부분을 차지한다[6]. *Haemophilus* 종은 X 또는 V 인자와 같은 특수한 성장인자를 필요로 하는 특징이 있어 배양이 까다롭고 성장까지 시간이 오래 걸린다[4]. *H. parainfluenzae*는 V 인자가 필요하다[4]. BACTEC 9240과 같은 자동혈액배양기는 영양 요구도가 높고 느리게 자라는 균종도 빠르고 민감하게 검출할 수 있어서[7], 5일 안에 임상적으로 중요한 병원균들은 대부분 검출된다[8]. 과거 HACEK군 등에 의한 심내막염을 진단하기 위해 2주까지 배양을 연장하도록 권장하기도 하였지만[9], 현재는 배양시간을 연장하여도 배양 양성률을 높이는 효과가 없는 것으로 보고되고 있다[10-12]. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서는 심내막염 진단에도 표준적인 5일간의 혈액배양을 권장하며, 5일까지 혈액배양이 음성일 때 초콜릿 한천배지에 계대배양하는 것을 권장한다[8]. 국내에서 보고된 *Haemophilus* 종에 의한 심내막염 증례들은 자동화 혈액배양기에서 1-5일 만에 균 성장이 검출되거나, 5-8일 사이에 동정결과가 보고되었다[13-15]. 따라서 이 증례에서 오랫동안 배양이 지연된 것은 원인균이 *Haemophilus* 종인 것 만으로는 설명할 수 없다.

이 증례는 첫 혈액배양을 시행할 때 이미 3세대 세팔로스포린을 투여 중이었다. 입원 2일째 항생제 복용을 중단하고, 입원 9일째 시행한 혈액배양에서 배양 10일만에 양성이었다. 채혈 전 항생제 투여로 배양 양성률이 100%에서 64%까지 감소하는 등[16], 채혈 전 항생제 투여는 배양 음성 심내막염의 중요한 원인이 된다[3]. 세균의 세포벽 합성을 차단하는 β -lactam 계열의 항생제들은 '항생제 후 효과'가 오래 지속될 수 있다[17]. 본 증례에서 동정된 *H. parainfluenzae*는 β -lactamase 음성으로 모든 β -lactam제제에 감수성이었기 때문에 혈액배양 전 투여한 cefpodoxime 때문에 초기 혈액배양이 실패한 것으로 추정된다. 따라서 감염성 심내막염이 의심되는 환자에서 선행하는 항생제 투여로 혈액배양이 음성일 때 단기간 치료받은 환자는 3일, 장기간 치료받은 경우 6-7일까지 항생제를 중단한 다음 혈액배양을 시도하는 것이 권장된다[18].

증례에서 증식편의 16S rRNA 직접 염기서열분석으로 4일만에

원인균을 동정할 수 있었다. 이는 동일한 날짜에 실시한 혈액배양에 비해 8일 정도 더 빨리 결과를 얻었다. *Actinobacillus*, *H. parainfluenzae* 등 HACEK군에 의한 혈액배양 음성 심내막염을 증식편에서 직접 염기서열분석을 시행하여 진단한 보고가 있다[19, 20]. 국내에서는 증식편에서 털곰팡이 균사체를 관찰하고 internal transcribed spacer (ITS) 1부위의 염기서열을 분석하여 *Aspergillus fumigatus*에 의한 심내막염을 진단한 예가 있다[14]. 심내막염으로 확진된 환자에서 증식편의 세균과 진균에 대한 직접 염기서열 분석검사의 민감도, 특이도는 96.0%, 95.3%에 달했지만 조직배양은 각각 24.3%, 56.4%로 진단 수행능이 떨어진다[21]. 염기서열 분석 대신 SeptiFast (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany)를 혈액이나 조직에 적용한 경우에도, 혈액배양보다 민감도가 훨씬 높았다[22]. 수술 전 항생제를 투여 받았던 환자에서, 조직증균배양 민감도가 10%인 반면, 조직의 직접 염기서열 분석방법의 민감도는 76%로 민감도 차이가 더욱 커진다[23]. 따라서 혈액배양 음성이지만 초음파검사서 판막의 증식물이 확인된 경우, 증식편에서 직접 16S rRNA 염기서열분석을 하는 것을 심내막염 진단기준의 하나로 포함할 것을 제안하고 있다[18]. 일반적으로 심내막염에 의한 사망률이 16-19%로 높기 때문에[5], 원인균을 신속하게 동정하고 적절한 치료하는 것은 환자의 예후에 결정적인 영향을 준다[24]. 심내막염 환자에서 수술적 치료를 하는 경우는 40-60% 정도로 알려져 있다[24]. 조직을 획득할 수 있는 경우 세균이나 진균을 대상으로 광범위 중합효소연쇄반응을 시행하고 직접 염기서열을 분석하는 것은 신속하고 민감하게 원인균을 검출하는 데 매우 유용할 것이다.

이 증례는 건강한 성인의 자연판막에서 발생한 심내막염으로, 심잡음이 없었기 때문에 초기에 심내막염을 의심하지 못하여 진단이 지연되었다. 심내막염의 위험인자로 구강 또는 치아 병변, 선행하는 치과시술, 류마티스열이나 선천성 심기형, 심장수술력과 같은 심장손상이나, 심장내 인공장치물 등이 보고되고 있다[25]. 이 증례에서 이러한 위험요인은 밝혀지지 않아 진단이 더 어려웠다. *Haemophilus* 종에 의한 심내막염은 분명한 위험인자가 없는 경우가 가장 흔하다[6]. 국내에서 보고된 *H. parainfluenzae*에 의한 심내막염 5예가 보고되었지만 이 중에서 치과시술력이 있었던 1예, 비위생적인 인슐린 피하주사력 1예에서만 위험인자를 추정할 수 있었다[13, 15, 26, 27]. *H. parainfluenzae* 심내막염의 60%에서 색전증이 동반된다[6]. 통상적으로 아급성 심내막염에서 25%정도인 것과 비교했을 때 이는 훨씬 높은 비율이며, *H. parainfluenzae* 증식물이 잘 부서지는 특성 때문으로 추정된다[6]. 이때 가장 흔하게 침범되는 장기는 뇌, 사지, 비장, 폐이다[6]. 이 증례도 입원 시부터 두통이 있었고 자기공명영상에서 다발성 뇌경색을 보여 *H. parainfluenzae*에 의한 심내막염의 특성에 맞는 소견이었다. 이전에 국내 보고된 *H. parainfluenzae*에 의한 심내막염 증례보고에

서도 급성 뇌경색이 합병되었다[26]. 색전증과 같은 합병증의 발생은 사망률을 높인다[27]. *H. parainfluenzae* 심내막염은 위험인자가 없는 정상인에서 발생할 수 있고, 색전증을 잘 동반하기 때문에 신속한 원인균 규명과 치료가 필요하다.

저자는 증식편 조직 16S RNA 직접 염기서열분석으로 *H. parainfluenzae*를 동정하여 심내막염 원인균을 진단한 국내 첫 증례로 보고하는 바이다. 증식편을 얻을 수 있을 때, 조직에서 직접 광범위 중합효소반응 및 직접 염기서열분석을 시행하는 것이 심내막염 확진에 유용할 것으로 생각한다.

요 약

HACEK 군은 전체 심내막염 중 3-6%를 차지하며, 배양 음성 심내막염의 주요 원인이다. 혈액배양이 지연된 *H. parainfluenzae* 심내막염에서 증식편을 직접 염기서열 분석방법으로 진단한 증례를 보고한다. 건강했던 26세 남자가 2011년 3월 27일 간헐적 고열을 주소로 응급실에 내원하여 cefpodoxime을 5일간 처방받았다. 응급실과 입원 후 병실에서 각각 6쌍과 11쌍의 혈액배양 검사를 실시하였고 혈액은 BACTEC Plus Aerobic/F (Becton-Dickinson, USA)와 Lytic Anaerobic/F Plus (BD, USA)에 세트로 접종하였다. 심초음파 검사에서 승모판 후방에 큰 증식물이 관찰되어 심내막염으로 진단되었다. 입원 11일째 증식물 제거술 및 승모판 성형술을 시행한 후 증식편을 thioglycolate 액체배지, 혈액한천배지, 브루셀라 혈액한천배지, MacConkey 배지에 7일간 배양하였으나 균은 자라지 않았다. 증식편에서 16S rRNA를 직접 염기서열 분석검사에서 *H. parainfluenzae*를 동정하였다. 입원 9일째 시행한 5쌍의 배양 중 2쌍의 호기성병에서 혈액 배양 10일, 14일 만에 균이 배양되었다. VITEK NHI card (bioMérieux, France)를 이용하여 *H. parainfluenzae*로 동정하였다. 감염성 심내막염, 특히 배양 음성 심내막염 환자에서 증식편을 직접 염기서열 분석하여 원인균을 동정하는 것은 매우 유용한 진단법이 될 것이다.

참고문헌

- Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG Jr, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. Clin Infect Dis 2000;30:633-8.
- Lamas CC and Eykyn SJ. Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. Heart 2003;89:258-62.
- Mandell GL, Bennett JE, et al. eds. Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2010:1067-112.
- Versalovic J, Carroll KC, et al. eds. Manual of clinical microbiology. 10th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2011: 588-98.
- Steckelberg JM, Melton LJ 3rd, Ilstrup DM, Rouse MS, Wilson WR. Influence of referral bias on the apparent clinical spectrum of infective endocarditis. Am J Med 1990;88:582-8.
- Darras-Joly C, Lortholary O, Mainardi JL, Etienne J, Guillemin L, Acar J. Haemophilus endocarditis: report of 42 cases in adults and review. Haemophilus Endocarditis Study Group. Clin Infect Dis 1997;24:1087-94.
- Rohner P, Pepey B, Auckenthaler R. Comparative evaluation of BACTEC aerobic Plus/F and Septi-Chek Release blood culture media. J Clin Microbiol 1996;34:126-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for blood cultures; Approved guideline. CLSI document M47-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2007.
- Washington JA 2nd. Blood cultures: principles and techniques. Mayo Clin Proc 1975;50:91-8.
- Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. Clin Infect Dis 2005; 41:1677-80.
- Doern GV, Davaro R, George M, Campognone P. Lack of requirement for prolonged incubation of Septi-Chek blood culture bottles in patients with bacteremia due to fastidious bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 1996;24:141-3.
- Forward KR. An evaluation of extended incubation time with blind subculture of blood cultures in patients with suspected endocarditis. Can J Infect Dis Med Microbiol 2006;17:186-8.
- Huh JH, Bae SY, Kim JS, Lee KN, Lee CK. A case of *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis. Korean J Clin Microbiol 2009;12:78-81.
- Hong KW, Lee JA, Park HW, Kwon HL, Cho SJ, Kim JS, et al. A case of infective endocarditis caused by *Aspergillus fumigatus* in a liver transplant recipient. Korean J Med 2008;75:115-8.
- Ryu KH, Choi HJ, Park SH, Park SH, Lee MA. Two cases of *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis. Infect Chemother 2003;35:345-9.
- Pazin GJ, Saul S, Thompson ME. Blood culture positivity: suppression by outpatient antibiotic therapy in patients with bacterial endocarditis. Arch Intern Med 1982;142:263-8.
- Graig WA and Gudmundsson S. Postantibiotic effects. In: Lorian V. ed. Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1996:296-329.
- Horstkotte D, Follath F, Gutschik E, Lengyel M, Oto A, Pavie A, et al. Guidelines on prevention, diagnosis and treatment of infective endo-

- carditis executive summary; the task force on infective endocarditis of the European society of cardiology. *Eur Heart J* 2004;25:267-76.
19. Kelesidis T, Kelesidis I, Lewinski MA, Humphries R. Establishing diagnosis of *Haemophilus parainfluenzae* as etiology of culture-negative endocarditis using DNA sequence analysis on tissue specimen. *Am J Med* 2011;124:e9-e10.
 20. Westling K and Vondracek M. *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* (HACEK) identified by PCR/16S rRNA sequence analysis from the heart valve in a patient with blood culture negative endocarditis. *Scand J Infect Dis* 2008;40:981-3.
 21. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems 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;86:195-202.
 22. Fernández AL, Varela E, Martínez L, Martínez A, Sierra J, González-Juanatey JR, et al. Evaluation of a multiplex real-time PCR assay for detecting pathogens in cardiac valve tissue in patients with endocarditis. *Rev Esp Cardiol* 2010;63:1205-8.
 23. Voldstedlund M, Nørum Pedersen L, Baandrup U, Kjaergaard KE, Fuursted K. Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. *APMIS* 2008;116:190-8.
 24. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG Jr, Bayer AS, 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;169:463-73.
 25. Winn WC, Allen SD, et al. eds. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 1997:429-52.
 26. Kang MH, Lim KR, Kim TS, Kim SH, Kim GH, Oh WS, et al. A case of early valve replacement for *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis complicated with acute cerebral infarctions. *Infect Chemother* 2011;43:270-4.
 27. Yang DJ, Ryu YS, Chung MY, Park EK, Park JY, Cho YB, et al. A case of *Haemophilus parainfluenzae*-related tricuspid valve endocarditis in an unhygienically insulin-injected patient. *Korean J Med* 2009;77(S): S1170-3.
 28. Thuny F, Avierinos JF, Tribouilloy C, Giorgi R, Casalta JP, Milandre L, et al. Impact of cerebrovascular complications on mortality and neurologic outcome during infective endocarditis: a prospective multicentre study. *Eur Heart J* 2007;28:1155-61.