

Aus dem  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Institute für Infektionsmedizin  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Herrmann

---

**Kulturbasierte und kulturunabhängige molekulare  
Endokarditis-Diagnostik aus Herz-Biopsien**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

vorgelegt von Oliver Robert Wick  
geb. am 23.3.1988 in Bad Dürkheim

# **Inhalt**

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | <b>Zusammenfassung/Summary</b> . . . . .   | 4  |
| 2     | <b>Einleitung</b> . . . . .  | 8  |
| 2.1   | Technik, Ablauf und Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion . . . . .  | 8  |
| 2.2   | Infektiöse Endokarditis . . . . .  | 9  |
| 2.2.1 | Historische Entwicklung . . . . .  | 9  |
| 2.2.2 | Prominente Todesfälle . . . . .  | 10 |
| 2.2.3 | Epidemiologie . . . . .  | 11 |
| 2.2.4 | Ätiologie und Pathogenese . . . . .  | 11 |
| 2.2.5 | Klinik und Diagnostik . . . . .  | 12 |
| 2.2.6 | Erregerspektrum, Therapie und Prävention . . . . .   | 14 |
| 2.3   | Zielsetzung der Studie . . . . .   | 16 |
| 3     | <b>Material und Methoden</b> . . . . .   | 17 |
| 4     | <b>Ergebnisse</b> . . . . .  | 19 |
| 4.1   | Allgemeine Probandaten . . . . .   | 19 |
| 4.2   | Kultureller Nachweis . . . . .   | 21 |
| 4.2.1 | Ergebnisse der Kultur des bioptischen Materials in den jeweiligen Altersgruppen . .                                      | 21 |
| 4.2.2 | Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur in den jeweiligen Altersgruppen .  | 23 |
| 4.2.3 | Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur auf Festmedien in den jeweiligen<br>Altersgruppen . . . . .              | 25 |
| 4.2.4 | Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur in Flüssigmedien in den jeweiligen<br>Altersgruppen . . . . .            | 27 |
| 4.3   | 16S-rDNA-PCR und Sequenzierung . . . . .   | 29 |
| 4.3.1 | Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR in den jeweiligen Altersgruppen . . . . .  | 29 |
| 4.3.2 | Erregerspektrum der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben in den jeweiligen<br>Altersgruppen . . . . .                           | 31 |
| 4.4   | Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR mit denen der konventionellen<br>Verfahren . . . . .                           | 33 |
| 4.4.1 | Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR mit denen der Kultur . . . . .   | 33 |
| 4.4.2 | Darstellung des Anreicherungsstatus für unterschiedliche Befundkonstellationen . .                                       | 35 |
| 4.4.3 | Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR mit denen der Kultur des bioptischen<br>Materials und der Blutkultur . . . . . | 38 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.4.4 | Darstellung des diagnostischen Benefits durch Anwendung der 16S-rDNA-PCR . . .   | 40 |
| 4.4.5 | Statistische Auswertung der diagnostischen Verfahren . . . . .   | 42 |
| 5     | <b>Diskussion</b> . . . . .  | 43 |
| 5.1   | Evaluation der Ergebnisse der konventionellen Diagnostik . . . . .   | 43 |
| 5.2   | Evaluation der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR vor dem Hintergrund der Ergebnisse<br>der Kultur des biotischen Materials . . . . . | 44 |
| 5.3   | Evaluation der kombinierten Anwendung kultureller und molekularbiologischer<br>Verfahren . . . . .                             | 47 |
| 5.4   | Zusammenfassung der Vor- und Nachteile molekularbiologischer Verfahren und<br>Ausblick . . . . .                               | 48 |
| 6     | <b>Literaturverzeichnis</b> . . . . .  | 51 |
| 7     | <b>Publikationen/Danksagung</b> . . . . .  | 59 |
| 7.1   | Mitautorenschaften . . . . .   | 59 |
| 7.2   | Danksagung . . . . .   | 60 |
| 8     | <b>Lebenslauf</b> . . . . .  | 61 |

# 1 Zusammenfassung/Summary

Die 16S-rDNA-PCR als Diagnostikum der infektiösen Endokarditis wird in den aktuellen modifizierten Duke-Kriterien nicht berücksichtigt. Die vorliegende Promotionsarbeit dient der Evaluation der Bedeutung dieser Methode im diagnostischen Prozess bei Verdacht auf Vorliegen einer infektiösen Endokarditis auf Grundlage einer bisher in der Literatur nicht beschriebenen Datenmenge. Im Rahmen der Studie wurden am Universitätsklinikum des Saarlandes im Zeitraum von August 2008 bis Januar 2012 1153 primär unselektierte, intraoperativ entnommene Herzbiopsien mikrobiologischer Diagnostik unterzogen. Die konventionellen Methoden zum Erregernachweis bestehend aus Gram-Färbung und kultureller Anzucht von bioptischem Material wurden durch die kulturunabhängige molekularbiologische Methode der 16S-rDNA-PCR, gefolgt von anschließender Sequenzierung der Nukleotidsequenz, ergänzt. Bei klinischem Verdacht auf Vorliegen einer infektiösen Endokarditis wurden Blutkulturen in unterschiedlicher Anzahl abgenommen. Im Rahmen der qualitativen Analyse der verfahrensspezifischen Erregerspektren wurden nach kultureller Anzucht des bioptischen Materials signifikant häufiger typische Vertreter der Hautflora gefunden ( $n = 178/209$ ; 85,2 %), wohingegen mittels 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung klassische Erreger der infektiösen Endokarditis signifikant häufiger nachgewiesen wurden ( $n = 88/121$ ; 72,7 %). Der quantitative Vergleich der Verfahren zeigte deutlich höhere Raten des Nachweises von Erregern für die kulturelle Anzucht ( $n = 209$  vs.  $n = 121$  im Rahmen der 16S-rDNA-PCR), was in Zusammenschau mit den qualitativen Unterschieden als Hinweis auf die höhere Spezifität der molekularbiologischen Verfahren einhergehend mit einer niedrigeren Frequenz falsch-positiver Ergebnisse gewertet werden kann.

Durch die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Befundkonstellationen nach Synopsis der kulturellen und molekularbiologischen Ergebnisse wurde gezeigt, dass die 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung einen wichtigen Beitrag in der Diagnostik kulturnegativer Endokarditiden ( $n = 76$ ) leisten kann. Insbesondere Vertreter der HACEK-Gruppe, *Coxiella burnetii* und *Tropheryma whippelii* konnten ausschließlich mittels 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung nachgewiesen werden ( $n = 4$ ).

Eine weitere sinnvolle Anwendung fanden die molekularbiologischen Verfahren in der Verifizierung bzw. Falsifizierung von kulturell erfolgten Nachweisen von typischen Hautkeimen. Die klinische Bedeutung positiver kultureller Erregernachweise bei gleichzeitigem Vorliegen eines negativen 16S-rDNA-PCR/Sequenzierungsbefunds ( $n = 164$ )

wurde dabei durch zwei Befunde in Frage gestellt: Im Vergleich mit den PCR-positiven Befundkonstellationen wurden prinzipiell kontaminationsverdächtige typische Hautkeime bei negativem 16S-rDNA-PCR/Sequenzierungsergebnis kulturell signifikant häufiger nachgewiesen (n = 157/164; 95,7 % vs. n = 33/121; 27,3 % bei PCR-positiven Befundkonstellationen). Des Weiteren wurde gezeigt, dass im Vergleich mit der Befundkonstellation mit identischem Erregernachweis bei Vorliegen eines negativen 16S-rDNA-PCR-Ergebnisses und positiver Kultur der Erregernachweis signifikant häufiger erst im Rahmen der kontaminationsanfälligen Anreicherungskultur mittels Flüssigmedien gelungen ist (n = 156/164; 95,1 % vs. n = 4/35; 11,4 % in der Gruppe mit identischen Ergebnissen im Rahmen der Kultur und 16S-rDNA-PCR).

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass es sich bei den kulturell positiven Befunden mit negativem Ergebnis im Rahmen der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung mit erhöhter Wahrscheinlichkeit um den Nachweis von Kontaminanten handeln könnte, die erst nach Einsatz molekularbiologischer Methoden begründet als solche verdächtigt werden können.

In Zusammenschau der Ergebnisse der kulturellen Anzucht des bioptischen Materials, der Blutkultur und der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung wurde deutlich, dass der molekularbiologische Erregernachweis eine wichtige Rolle beim Klären von Diskrepanzen innerhalb der konventionellen Diagnostika (n = 157) spielen kann. Schlussendlich diene die 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung auch zur Verifizierung bzw. Falsifizierung übereinstimmend positiver oder negativer konventioneller Methoden (n = 237), was die diagnostische Sicherheit der Befunde erhöht hat.

Die Rolle der molekularbiologischen Verfahren im Rahmen der Diagnostik der infektiösen Endokarditis konnte abschließend durch einen errechneten Youden-Index von 0,938 untermauert werden, der deutlich über denen der konventionellen diagnostischen Verfahren lag (max. 0,301 für kulturelle Anzucht auf Festmedien). In Anbetracht der diagnostischen Vorteile und der stetigen Weiterentwicklung und -verbreitung kulturunabhängiger Verfahren erscheint die Aufnahme in die Duke-Kriterien angebracht.

## Culture-based and culture-independent molecular diagnostic tests for endocarditis in cardiac biopsies.

16S rDNA PCR as a diagnostic means of infectious endocarditis is not being appreciated in the current version of the modified Duke criteria. The aim of this thesis is therefore to evaluate the relevance of this method in the diagnostic process of cases of supposed infectious endocarditis on the basis of a database previously undescribed in literature.

In this study, a total of 1153 primarily unselected, extirpated heart biopsies taken from August 2008 until January 2012 were subject to microbiological diagnostics in the Saarland University Medical Center. Conventional methods for the detection of a possible causative pathogen such as gram-staining and culture have been complemented by the culture-independent molecular biological method of 16S rDNA PCR, followed by direct sequencing of the nucleotide sequence. In case of clinical suspicion of infectious endocarditis, different numbers of blood culture vials have been taken.

In the context of the qualitative analysis of the procedure-specific range of pathogens, conventional culture of bioptic material yielded a significantly higher amount of typical representatives of the skin flora ( $n = 178/209$ ; 85.2 %), whereas classic causative agents of infectious endocarditis were significantly more often detected with 16 S rDNA PCR/sequencing ( $n = 88/121$ ; 72.7 %). The quantitative comparison of the different methods showed a markedly higher rate of detection of pathogens with conventional culture ( $n = 209$  vs.  $n = 121$  with 16S rDNA PCR), which in synopsis with the qualitative differences can be considered an indication of the increased specificity and the lower rate of false-positive findings in molecular biological methods.

The synopsis of the findings in conventional culture and molecular biological methods followed by the comparison of the different diagnostic constellations highlights the important contributions of 16S rDNA PCR followed by direct sequencing to the diagnostics of cases of culture-negative infectious endocarditis ( $n = 76$ ). Above all, representatives of the HACEK group of pathogens, *Coxiella burnetii* and *Tropheryma whipplei* could only be detected with 16S rDNA PCR followed by direct sequencing ( $n = 4$ ).

Molecular biological methods are also of use when it comes to verifying or falsifying cases of cultural detection of typical skin pathogens. The clinical significance of positive cultures with negative results in 16S rDNA PCR ( $n = 164$ ) followed by direct sequencing is questioned by two findings: Typical skin pathogens suspicious of being contaminants have been detected with a significantly higher rate in biopsies falling into the culture-positive/16S rDNA PCR-

negative category (n = 157/164; 95.7 % vs. n = 33/121; 27.3 % in PCR-positive constellations). Moreover the comparison between the cases of identical conventional and molecular biological identification of the pathogen and the culture-positive cases with negative results in 16S rDNA PCR followed by direct sequencing shows that the positive findings of pathogens in the latter group coincide with a significantly higher rate of positive enrichment cultures using liquid growth media (n = 156/164; 95.1 % vs. n = 4/35; 11.4 % in the group featuring identical results in culture and 16S rDNA PCR) which are inherently prone to contamination.

In summary, these results allow the conclusion that the culture-positive cases with negative results in 16S rDNA PCR followed by direct sequencing are characterized by a higher share of contaminants compared to the other diagnostic constellations. However, the possibility of contamination can only be reasonably considered if there is molecular biological evidence pointing in this direction.

The synopsis of the results of valve culture, blood culture and 16S rDNA PCR/direct sequencing shows that the molecular biological methods can be a useful tool in clearing up discrepancies between the conventional cultural methods (n = 157). Another important application of 16S rDNA PCR/direct sequencing can be found in the verification of identical results of the conventional diagnostic means (n = 237), leading to improved diagnostic reliability.

Finally, molecular biological methods could be shown to be characterized by a Youden index of 0.938, a value remarkably higher than those of the conventional diagnostic means headed by a Youden index of 0.301 characterizing culture on solid growth media. In the light of the diagnostic advantages, constant improvements and ongoing development and the increasingly widespread availability of culture-independent techniques, the inclusion of these methods in the Duke criteria should be considered.

## 2 Einleitung

### 2.1 Technik, Ablauf und Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Technik zur Amplifikation von definierten DNA-Bereichen. Die Selektionierung der entsprechenden DNA-Abschnitte im Rahmen der in-vitro-Klonierung erfolgt mittels Oligonukleotid-Primern von ca. 18-25 Nukleotiden Länge, welche spezifisch an diese Sequenzen binden.

Anschließend erzeugt in Anwesenheit von Substrat in Form der Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP eine hitzestabile DNA-Polymerase zur Ziel-DNA komplementäre Gegenstränge, welche wiederum als Vorlage für die Herstellung zusätzlicher Kopien im Rahmen weiterer Zyklen der Kettenreaktion dienen. Ein einzelner Zyklus der PCR besteht dabei aus mehreren Schritten: Im Rahmen der Denaturierung der Ziel-DNA kommt es bei mittels Thermocycler erzeugten Temperaturen von 93-95 °C zur Spaltung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge. Die nun folgende DNA-Synthese nach erfolgter Primer-Hybridisierung findet bei ca. 70-75 °C statt, woran sich am Ende der Kettenreaktion die Phase der Renaturierung abhängig von der Schmelztemperatur der Ziel-DNA bei Temperaturen zwischen 50-70 °C anschließt.

Seit der Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion durch Kary Mullis im Jahre 1983 wurden zahlreiche Varianten der klassischen Technik entwickelt, wie z.B. die Echtzeit-PCR (= real-time PCR) bzw. quantitative PCR (= qPCR) oder die Reverse-Transkriptase-PCR (= RT-PCR), welche für spezifische Fragestellungen (Nachweis von Infektionserkrankungen oder Genmutationen, Typisierung von Genen zur Prüfung von Gewebeverträglichkeit vor Transplantationen oder Zuordnung von Gewebeproben zu Personen im Bereich der Rechtsmedizin) zum Einsatz kommen können.<sup>1</sup>



## 2.2 Infektiöse Endokarditis

### 2.2.1 Historische Entwicklung

Die jahrhundertelange Geschichte der Erforschung der infektiösen Endokarditis ist geprägt von sich ablösenden, aber auch von sich ergänzenden Konzepten der Ätiopathogenese. Dabei war es die Synthese aus wissenschaftlichem Fortschritt im gegen Ende des 19. Jahrhunderts zunehmend an Bedeutung gewinnenden Bereich der Mikrobiologie und den ständig wachsenden praktisch-klinischen Erkenntnissen, die der Medizin den Weg zum heutigen Kenntnisstand ermöglichte.

Den Grundstein hierfür legte Lazare Rivière, Professor der Medizin an der Universität Montpellier, im Jahre 1646, indem er als einer der Ersten pathologische Veränderungen des Endokards und der Herzklappen beschrieb. 1797 prägte Matthew Baillie den Begriff der „rheumatischen Karditis“ und vermutete eine Verbindung zwischen Rheumatismus und Herzerkrankungen; er hielt jedoch entzündliche Vorgänge im Rahmen der Pathogenese für selten. Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur heutigen Nomenklatur wurde 1806 von Jean Nicolas Corvisart getan: Er gebrauchte erstmals den ursprünglich botanischen Terminus der „Vegetation“ und sah aufgrund der Ähnlichkeit ihrer makroskopischen Morphologie einen pathogenetischen Zusammenhang mit venerischen Wucherungen und der Syphilis, was als einer der erster Versuch gilt, eine Ursache für die beobachteten Veränderungen des Endokards zu benennen. 1815 beschrieb Friedrich Kreysig die „polypöse Karditis“ und vertrat erstmals die Meinung, dass die Vegetationen auf einen entzündlichen Prozess zurückzuführen seien. Bouillaud machte 1835 einen weiteren Schritt in Richtung der heute gebräuchlichen Terminologie und benutzte erstmals den Begriff „Endocardium“. Die sich häufig manifestierende extrakardiale Symptomatik der Endokarditis wurde erstmals 1852 von William Senhouse Kirkes in einen Zusammenhang mit der Grunderkrankung gebracht. Er beschrieb dabei die Möglichkeit von septischen Embolien und führt in diesem Zusammenhang Schlaganfälle, Infarkte anderer Organe und auch kutane Läsionen auf die kardiale Grunderkrankung zurück. Erste Ergebnisse durch die mikroskopische Begutachtung von im Rahmen der infektiösen Endokarditis pathologisch veränderten Herzklappen wurden 1855 von Rokitansky erzielt: Er erwähnte kleine Granulationen auf der Mitralklappe. Erst 1869 jedoch begründete Emmanuel Winge die Theorie, dass Erreger durch Hautläsionen in die Blutbahn übertreten und über die Venen ins Herz gelangen können, wo daraufhin die Adhäsion an das Endokard erfolgt. Er schlug die Bezeichnung „Mycosis endocardii“ vor. Die Assoziation mit anderen Infektionskrankheiten vermutete 1870 Samuel Wilks, indem er

Scharlach als mögliche Ursache der Klappenläsionen bezeichnete. Diesen Gedanken führte Edwin Klebs 1878 konsequent weiter, indem er postulierte, dass alle Fälle von Endokarditis infektiöser Genese seien: Bei einer Autopsiereihe konnte er in allen 27 Fällen Mikroorganismen in den Klappenvegetationen nachweisen. Ottomar Rosenbach gelang es darüber hinaus im Jahre 1876 erstmals, die infektiöse Endokarditis im Tierversuch zu reproduzieren.

Auch der Versuch der klinischen Klassifikation kam um die Zeit des Jahrhundertwechsels weiter voran: 1884 sprach Grancher als erster von der „infektiöse Endokarditis“, 1903 prägte Hugo Schottmüller den Begriff der „Endocarditis lenta“. Libman und Celler stellten 1910 der innerhalb weniger Tage zum Tode führenden akuten Endokarditis eine subakute Form gegenüber, und William Osler war es, der schließlich die Einteilung in eine akute und chronische Form vornahm.<sup>2</sup>

### **2.2.2 Prominente Todesfälle**

Obwohl es sich bei der infektiösen Endokarditis um eine verhältnismäßig seltene Erkrankung handelt, konnte sie als Todesursache bei einer Reihe von prominenten historischen Persönlichkeiten nachgewiesen werden. Gustav Mahler (1860-1911), einer der bekanntesten Komponisten der Spätromantik, fiel erstmals 1907 mit einem zu diesem Zeitpunkt kompensierten Mitralklappenvitium auf. Zum Jahreswechsel 1910/11 – Mahler befand sich in New York, wo er am 21. Februar 1911 sein letztes Konzert dirigieren sollte – litt er unter einer neuerlichen Episode häufig rezidivierender Tonsillitiden. Am 24. Februar 1911 erkrankte er an einer bakteriellen Endokarditis, weswegen er bei einem der damals bekanntesten Ärzte New Yorks, Emanuel Libman, in Behandlung war, dem der Nachweis einer Streptokokken-Bakteriämie mittels Blutkulturen gelang. Nach vorübergehender klinischer Besserung kam es zu einer erneuten Exazerbation der Erkrankung Anfang Mai 1911 im Sinne einer raschen Verschlechterung des Allgemeinzustands einhergehend mit septischen Abszessen, woraufhin Mahler am 18. Mai 1911 verstarb.

Auch Alois Alzheimer (1864-1915), Psychiater und Neuropathologe, Entdecker der nach ihm benannten neurodegenerativen Erkrankung und zuletzt Direktor der Königlich Psychiatrischen und Nervenlinik der Friedrich-Wilhelm-Universität Breslau, verstarb am 19. Dezember 1915 im Alter von 51 Jahren an den Folgen einer infektiösen Endokarditis.<sup>3</sup>

### 2.2.3 Epidemiologie

Die epidemiologische Situation der infektiösen Endokarditis in der entwickelten Welt befindet sich im Wandel.<sup>4</sup> An die Stelle von hauptsächlich jüngeren Patienten mit vorbestehenden Klappenpathologien auf dem Boden eines abgelaufen rheumatischen Fiebers, welche früher den Großteil des Patientengutes ausmachten, sind nun ältere Patienten getreten, die nicht selten im Rahmen von medizinischer Diagnostik und Therapie sonstiger Erkrankungen eine infektiöse Endokarditis entwickeln.<sup>5</sup>

Erklärbar ist dies durch die heutzutage weitgehend optimierte Behandlung von Streptokokken-Infekten, was für den Rückgang des rheumatischen Fiebers als Risikofaktor verantwortlich ist; auf der anderen Seite sind neue prädisponierende Faktoren hinzugetreten, so z.B. der verbreitete Einsatz von Klappenprothesen, die mit steigender Lebenserwartung vermehrt auftretende degenerative Klappensklerose, die steigende Zahl an medizinischen Eingriffen mit Bakteriämierisiko, aber auch intravenöser Drogenabusus.<sup>6</sup>

Im Gegensatz dazu stellt das rheumatische Fieber mit konsekutiven Klappenvitien immer noch den Hauptrisikofaktor für die Erkrankung an einer infektiösen Endokarditis in Entwicklungsländern dar.<sup>7</sup>

Die Inzidenz der infektiösen Endokarditis schwankt je nach Quelle zwischen 3 bis 10/100'000 Einwohner/Jahr, mit einem Maximum in der Altersgruppe der 70- bis 80-Jährigen. Dabei liegt die Geschlechterverteilung bei über 2:1 (Männer:Frauen).<sup>5</sup>

### 2.2.4 Ätiologie und Pathogenese

Das intakte Endothel des Endokards und der Herzklappen ist für Bakterien schwer kolonisierbar. Läsionen unterschiedlichster Art dieses primär sehr widerstandsfähigen Zellverbandes können jedoch zur mechanischen Schädigung und infolge dessen zur Freilegung von subendothelialen thrombogenen Gewebeschichten führen. Die anschließende Initiation von physiologischen Heilungsvorgängen, was unter anderem die Formation von Fibrin- und Thrombozytenkonglomeraten im Bereich der Klappenläsion bedeutet, kann wiederum in eine nicht-bakterielle thrombotische Endokarditis (NBTE) münden, die zur erhöhten Suszeptibilität gegenüber Adhäsion und Infektion mit in der Blutbahn zirkulierenden Krankheitserregern führt.<sup>5</sup>

Die auslösenden Noxen dieser pathogenetischen Kaskade können zum einen mechanischer Natur sein und mit medizinischen Eingriffen (z.B. Durchführung von

Herzkatheteruntersuchungen) oder auch beispielsweise mit pathologischen Strömungsverhältnisse des Blutes in Zusammenhang stehen. Auch inflammatorische Vorgänge am Endothel, wie sie beispielsweise im Rahmen eines rheumatischen Fiebers vorkommen, sind als Ursache denkbar. Nicht zuletzt stellen aber auch degenerative Prozesse am alternden Herzen einen Faktor dar, der in der Pathogenese eine Rolle spielen kann, da bei ca. 50 % aller an einer bakteriellen Endokarditis leidenden Patienten über 60 Jahren degenerative Klappenläsionen echokardiographisch nachweisbar sind.<sup>8</sup>

Ein weiterer Mechanismus der Krankheitsentstehung betrifft entzündlich veränderte Klappen, die jedoch keine mechanischen Schädigungen aufweisen. Hier kommt es durch die Expression von Integrinen der  $\beta$ 1-Familie auf der Oberfläche der Endothelzellen zur Anlagerung von zirkulierendem Fibronectin. Insbesondere *Staphylococcus aureus* nutzt diesen Umstand zur Adhäsion mittels Fibronectin-bindendem Protein,<sup>9</sup> aber auch andere klassische Erreger der Endokarditis besitzen typischerweise die Fähigkeit zur Adhärenz an entsprechende Matrix-Moleküle mit der Folge der Kolonisation und Ausbildung von Vegetationen.<sup>10</sup> Das Auftreten einer manifesten Infektion nach stattgehabter Bakteriämie wird dabei insbesondere von deren quantitativem und zeitlichem Ausmaß bestimmt.<sup>11</sup> Dennoch spielen niedriggradige Bakteriämien im Rahmen von Aktivitäten des täglichen Lebens wie z.B. nach dem Zähneputzen aufgrund ihrer schieren Häufigkeit eine wichtige Rolle in der Entstehung zahlreicher Fälle von infektiöser Endokarditis.<sup>12,13</sup>

### **2.2.5 Klinik und Diagnostik**

Ursächlich für die oftmals komplizierte Diagnostik und Therapie der bakteriellen Endokarditis ist die Vielfalt der Klinik, mit der sie sich manifestieren kann.<sup>14</sup> Dabei sind in Abhängigkeit von der Erregerspezies und von Wirtsfaktoren wie z.B. einer vorbestehenden Herzerkrankung, Alter und Immunstatus des Patienten sowohl hochakute Verläufe mit hohem Fieber, akuter kardialer Dekompensation und klinisch offensichtlicher infektiöser Genese als auch chronisch rezidivierende Verläufe mit subfebrilen Temperaturen und unspezifischer Allgemeinsymptomatik möglich, die eine Vielzahl an Differenzialdiagnosen zulassen. Abgesehen von immunsupprimierten und älteren Patienten, bei denen eine solche Allgemeinsymptomatik häufig fehlt,<sup>15</sup> sind einige – wenn auch unspezifische – Symptome bei einem Großteil des Patientenkollektivs zu beobachten, wie z.B. Fieber, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust in bis zu 90 % und pathologische Herzgeräusche in bis zu 85 % der Fälle.<sup>5</sup>

Entscheidend für die definitive Diagnosestellung sind die modifizierten Duke-Kriterien, welche sich in Major- und Minor-Kriterien unterteilen. Erstere umfassen den Nachweis von Endokarditis-spezifischen Erregern mittels Blutkulturen und die echokardiografisch gesicherte Beteiligung des Endokards oder der Herzklappen an dem pathologischen Prozess. Die Minor-Kriterien wiederum beinhalten neben prädisponierenden Faktoren, Fieber über 38 °C und nicht den Major-Kriterien genügenden mikrobiologischen Befunden auch vaskuläre und immunologische Symptome wie z.B. das Auftreten von Janeway-Läsionen, Osler-Knötchen oder arteriellen Embolien,<sup>16</sup> welche in 30 % der Fälle auftreten und häufig die führende Symptomatik darstellen.<sup>17</sup>

Entsprechend den Major-Kriterien sind die Echokardiographie und der kulturelle Erregernachweis aktuell als die zentralen diagnostischen Hilfsmittel anzusehen;<sup>5,18</sup> bei klinischem Verdacht auf infektiöse Endokarditis sollten diese Diagnostika unverzüglich zum Einsatz kommen.

Die transösophageale Echokardiographie als Verfahren mit hoher Sensitivität (90-100 %)<sup>19</sup> dient dem zuverlässigen bildmorphologischen Nachweis von Abszessen, Vegetationen und neu aufgetretenen Dehiszenzen von Klappenprothesen. Mit Einschränkungen der Aussagekraft dieses Verfahrens ist jedoch beispielsweise bei vorbestehenden Klappenläsionen (z.B. Mitralklappenprolaps), beim Vorliegen von zum Untersuchungszeitpunkt sehr kleinen Vegetationen unter 2 mm Größe und bei Begleiterkrankungen, die bildmorphologisch das Vorliegen von Vegetationen vortäuschen können, zu rechnen.<sup>5</sup>

Bei initial negativem echokardiographischem Befund und fortbestehendem klinischem Verdacht auf eine infektiöse Endokarditis muss spätestens 7-10 Tage später eine erneute Untersuchung zur Verlaufskontrolle erfolgen. Weitere Kontrolluntersuchungen beim Auftreten von Komplikationen und zur Überwachung des Ansprechens auf die Therapie sind ebenfalls obligatorisch.<sup>5</sup>

Die Abnahme von mehreren steril entnommenen Blutkulturen sollte bei entsprechendem klinischem Verdacht mit dem Ziel des direkten Erregernachweises und der Möglichkeit der Resistenztestung rasch und unbedingt vor Erstgabe der Antibiose erfolgen. Dennoch liegt in bis zu 31 % der Fälle eine kulturell negative infektiöse Endokarditis vor,<sup>20</sup> was zumeist auf vorherige antibiotische Anbehandlung oder eine Infektion mit schlecht kultivierbaren oder langsam wachsenden Erregern zurückzuführen ist und Diagnostik und Therapie zusätzlich erschweren kann.<sup>5</sup> In solchen Fällen stellen die molekularbiologischen Methoden aufgrund ihrer hohen Sensitivität ein effektives diagnostisches Mittel dar.

Als diagnostischer Goldstandard gilt allerdings nach wie vor der histologische Nachweis entsprechender pathologischer Prozesse und des ursächlichen Erregers am kardiochirurgisch resezierten Klappenmaterial.<sup>5</sup>

### 2.2.6 Erregerspektrum, Therapie und Prävention

Die initial kalkulierte antibiotische Therapie der infektiösen Endokarditis muss bei entsprechendem klinischem Verdacht unverzüglich nach Abnahme mehrerer Blutkulturen erfolgen. Bei gegebener Verträglichkeit sollten dabei in erster Linie stets bakterizide Wirkstoffe aus der Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Aminoglykoside zum Einsatz kommen, um eine effektive und effiziente Therapie zu gewährleisten. Die Therapiedauer beläuft sich auf vier bis sechs Wochen.<sup>5</sup>

Nach Vorliegen des Erregernachweises mit anschließender Resistenztestung sollte zu einer gezielten Antibiose übergegangen werden. Als typische Erreger der infektiösen Endokarditis sind dabei vor allem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* und *Enterococcus spp.* anzutreffen. Keime der HACEK-Gruppe (*Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*), *Coxiella burnetii* und *Tropheryma whipplei* sind – wenn auch deutlich seltener – ebenfalls klassische Vertreter des Erregerspektrums. Eine weitere nicht unbedeutende Rolle spielen koagulase-negative Staphylokokken,<sup>5</sup> wobei speziell im Falle dieser Erregergruppe die Abgrenzung zu möglichen Kontaminanten eine wichtige Aufgabe der klinischen Mikrobiologie darstellt.

Die zweite Säule in der Therapiestrategie der bakteriellen Endokarditis ist die Herzchirurgie; entsprechende Maßnahmen werden derzeit bei etwa 50 % der betroffenen Patienten im Laufe der Erkrankung notwendig.<sup>21</sup> Eine der Hauptindikationen für eine chirurgische Intervention stellt die Klappeninsuffizienz dar. Hierbei handelt es sich um die häufigste und gleichzeitig schwerwiegendste Komplikation der infektiösen Endokarditis, was die Notwendigkeit des notfallmäßigen herzchirurgischen Eingriffs begründet. Als weitere Hauptindikation gilt eine nicht kontrollierte Infektion, die sich häufig als perivalvuläre Infektion mit möglicher Abszessbildung darstellt und mit dem Vorhandensein schwer behandelbarer Erregern assoziiert sein kann. Schließlich ist auch bei drohender Embolisation die Operationsindikation unter anderem auf Grundlage der Größe und Mobilität der Vegetation abzuwägen.<sup>5</sup>

Die Prävention der infektiösen Endokarditis wird zunehmend restriktiv gehandhabt. Aktuelle Leitlinien empfehlen die prophylaktische Gabe von Amoxicillin oder Ampicillin bzw.

Clindamycin im Falle einer Allergie gegen die Erstlinien-Präparate lediglich im Rahmen von zahnärztlichen Hochrisiko-Eingriffen mit Manipulation an der Gingiva und im periapikalen Bereich oder mit Perforation der oralen Mukosa bei Hochrisiko-Patienten. Hierzu zählen Patienten mit stattgehabter infektiöser Endokarditis, Zustand nach Implantation einer Herzklappen-Prothese oder von sonstigen körperfremden Materialien zum Zwecke einer Klappenrekonstruktion und solche mit kongenitalen Herzerkrankungen.<sup>5</sup> Eine wichtige Rolle in der Prävention der infektiösen Endokarditis spielt des Weiteren eine adäquate Mundhygiene, da alltägliche Tätigkeiten wie Zähneputzen mit einer Bakteriämie-Rate von bis zu 100 %<sup>22</sup> vergesellschaftet sein können und bei mangelhafter Mundhygiene auch spontane Bakteriämien möglich sind.<sup>23</sup>

### 2.3 Zielsetzung der Studie

Die Suche nach der Begriffskombination „16S rDNA PCR“ und „infective endocarditis“ in großen medizinischen Online-Datenbanken wie pubmed zeigt, dass das wissenschaftliche Interesse an kulturunabhängigen, molekularbiologischen Verfahren in der medizinischen Mikrobiologie und an der weiteren Erforschung der infektiösen Endokarditis ungebrochen ist. Dieser Umstand wird durch Abb. 1 verdeutlicht, welche die stetig zunehmende Anzahl der Ergebnisse bei entsprechender Suche bis ins Jahr 2013 zeigt.

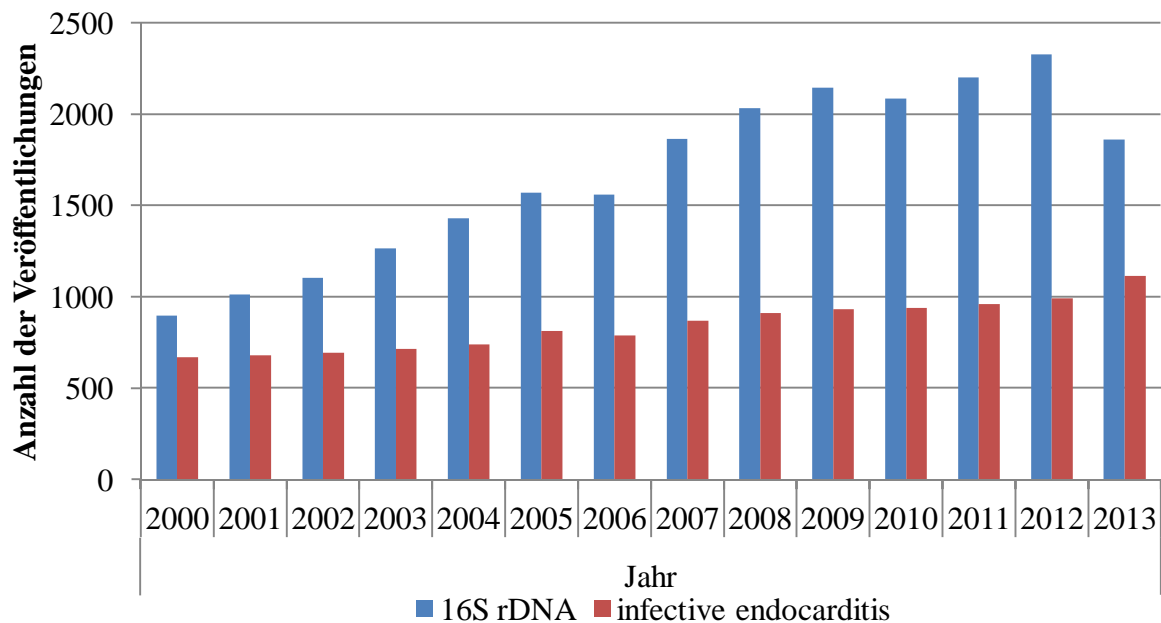


Abb. 1: Zeitliche Entwicklung der Anzahl der Veröffentlichungen zu den entsprechenden Suchbegriffen in der medizinischen Online-Datenbank pubmed.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung der 16S-rDNA-Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender Sequenzierung für die moderne mikrobiologische Diagnostik der infektiösen Endokarditis zu evaluieren, die Stärken und Schwächen des Verfahrens darzustellen und Möglichkeiten zukünftiger Entwicklungen aufzuzeigen. Die Grundlage der Auswertung ist dabei eine in der Literatur bisher nicht beschriebene Datenmenge, welche das Ergebnis der intensiven klinischen Zusammenarbeit und Kooperation der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie und des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes darstellt.



### 3 Material und Methoden

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive monozentrische Studie an 1153 unselektierten, intraoperativ entnommenen Herzbiopsien von 1050 Patienten, welche sich im Zeitraum von August 2008 bis Januar 2012 in der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie (Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Schäfers) des Universitätsklinikums des Saarlandes kardiochirurgischen Eingriffen unterzogen. Das so gewonnene biopsische Material unterschiedlicher Art wurde zur weiteren Diagnostik an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. M. Herrmann) des Universitätsklinikums des Saarlandes weitergeleitet. Hier wurden im Rahmen der Routinediagnostik zum Nachweis potentiell vorhandener bakterieller Erreger Gram-Präparate angefertigt, die kulturelle Anzucht des biopsischen Materials auf Fest- und in Flüssigmedien durchgeführt und 16S-rDNA-PCR-Diagnostik mit anschließender Sequenzierung der Nukleotidsequenz angewandt. Falls perioperativ der klinische Verdacht auf eine infektiöse Endokarditis bestand, wurden zusätzlich Blutkulturen in variabler Anzahl im Zeitraum zwischen vier Wochen vor und nach dem operativen Eingriff zur Kultur an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene versandt.

Zur kulturellen Anzucht des intraoperativ gewonnenen Probenmaterials wurde dieses zunächst mit 0,9% iger NaCl-Lösung zermörsert, mit doppelt konzentrierter brain-heart-infusion aufgegossen und anschließend zwei Tage auf Festmedien (Kochblut, Blut, MacConkey, Schaedler geteilt) und sieben Tage in Flüssigmedien (brain-heart-infusion und Thioglycolat-Lösung) als Anreicherungskultur angezüchtet.

Zur Durchführung der 16S-rDNA-PCR wurde ein Ansatz aus 10 µl Wasser, 12,5 µl PCR-Mix, 0,25 µl Primer-Lösung (16sfor: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 16s907r: CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) und 2,5 µl DNA der jeweiligen Probe nach entsprechender Extraktion mittels Quiagen oder Promega-Kits hergestellt. Der Ansatz wurde anschließend mittels Thermocycler nach folgendem Schema unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt: 95 °C über 7 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen der Exposition mit 95 °C über 30 Sekunden, 55 °C über 1 Minute und 72 °C über 3 Minuten. Nach einer weiteren Phase mit 72 °C über 10 Minuten wurde das Programm durch eine Temperaturreduktion auf 10 °C beendet. Zum Verdau des PCR-Produkts wurden je 4 µl Amplifikat zu 4 µl Exo Sab Ersatz-Tropfen pipettiert. Die Enzymaktivierung erfolgte durch Erwärmen des Ansatzes über mindestens 20 Minuten auf eine Temperatur von 37 °C im Thermomixer, die anschließende Enzymdeaktivierung durch eine Temperaturerhöhung auf 65 °C über weitere 20 Minuten. Die

Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch einen externen Dienstleister mit den Primern 16sfor and 16s519r (GWA TTA CCG CGG CKG CTG).

Nach Abschluss der mikro- und molekularbiologischen Diagnostik wurden die relevanten Daten [Geschlecht, Alter, Datum der Operation, Art des bioptischen Materials, Ergebnis der Gram-Färbung mit anschließender mikroskopischer Untersuchung, Ergebnis der Kultur des bioptischen Materials auf Fest- und in Flüssigmedien, Ergebnis der 16S-rDNA-PCR mit anschließender Sequenzierung, Datum und Ergebnis der Blutkultur (sofern durchgeführt)] durch mich gefiltert, aufbereitet, in einer Microsoft Excel-Datenbank katalogisiert und wie unten beschrieben ausgewertet. Die statistischen Berechnungen erfolgten mithilfe von IBM SPSS Statistics 17.0. Zur Anwendung kamen der exakte Fisher-Test, der T-Test und die logistische Regression.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Probanddaten

Tab. 1: Allgemeine Probanddaten.

|                                    | 16S rDNA PCR positiv<br>[n (%) bzw. MW ± SD] | 16S rDNA PCR negativ<br>[n (%) bzw. MW ± SD] | p-Wert              |
|------------------------------------|--|--|---------------------|
| Probenanzahl                       | 121 (10,5)                                   | 1032 (89,5)                                  |                     |
| Geschlecht (m/w)                   | 84 (69,4) / 37 (30,6)                        | 652 (63,2) / 380 (36,8)                      | n.s.                |
| Alter (Jahre)                      | 59,77 ± 16,25                                | 66,64 ± 13,51                                | <0,001*             |
| <b>Probenmaterial</b>              |  |  |                     |
| Aortenklappen                      | 71 (58,7)                                    | 852 (82,6)                                   | <0,001 <sup>§</sup> |
| Mitralklappen                      | 29 (24,0)                                    | 135 (13,1)                                   | <0,01 <sup>§</sup>  |
| Sonstige#                          | 21 (17,4)                                    | 45 (4,4)                                     | <0,001 <sup>§</sup> |
| <b>Mikroskopie (Gram-Färbung)</b>  |  |  |                     |
| Bakterien positiv                  | 16 (13,2)                                    | 4 (0,4)                                      | <0,001 <sup>§</sup> |
| Granulozyten positiv               | 33 (27,3)                                    | 107 (10,4)                                   | <0,001 <sup>§</sup> |
| Bakterien und Granulozyten positiv | 2 (1,7)                                      | 1 (0,1)                                      | n.b.                |
| <b>Kultur (Gewebe)</b>             |  |  |                     |
| positiv (gesamt)                   | 45 (37,2)                                    | 164 (15,9)                                   | <0,001 <sup>§</sup> |
| positiv (auf Festmedien)           | 32/45 (71,1)                                 | 8/164 (4,9)                                  | <0,001 <sup>§</sup> |
| positiv (in Flüssigmedien)         | 13/45 (28,9)                                 | 156/164 (95,1)                               | <0,001 <sup>§</sup> |
| <b>Blutkultur</b>                  |  |  |                     |
| durchgeführt <sup>°</sup>          | 75 (62,0)                                    | 319 (30,9)                                   | <0,001 <sup>§</sup> |
| positiv                            | 36/75 (48,0)                                 | 95/319 (29,8)                                | <0,01 <sup>§</sup>  |

\*T-Test, <sup>§</sup>Exakter Fisher-Test, <sup>°</sup>bis zu vier Wochen prä-/postoperativ

n.b. = nicht berechnet, n.s. = nicht signifikant

# Aneurysma der Aortenwurzel, Aortenklappennaht, Aortenwand, Aortenwurzel, Auflagerung Aortenklappe, endokarditische Perforation, Gewebe (nicht näher bezeichnet), Herzklappe (nicht näher bezeichnet), Herzklappenring, Klappenanteile, (biologische/mechanische) Klappenprothese, Klappenvegetation, Mitralklappensehnenfaden, Mitralklappenring, Mitralklappenthrombus, Pulmonalklappe, Raumforderung Mitralklappe, Thrombus, Trikuspidalklappenanteile

Die Mehrzahl der in die Studie eingeschlossenen Proben (89,5 %) war 16S-rDNA-PCR-negativ. Es gab keine signifikanten Unterschiede, was die Geschlechterverteilung innerhalb der 16S-rDNA-PCR-positiven und -negativen Gruppe angeht. Ein signifikant höheres Durchschnittsalter der Patienten konnte für die 16S-rDNA-PCR-negative Gruppe nachgewiesen werden (59,77 ± 16,25 vs. 66,64 ± 13,51 Jahre).

Bei der Gegenüberstellung der Anteile der unterschiedlichen Probenmaterialien fand sich sowohl für die 16S-rDNA-PCR-positiv als auch für die -negative Gruppe ein Überwiegen der Aortenklappen (58,7 % vs. 82,6 %), gefolgt von den Mitralklappen (24,0 % vs. 13,1 %)

und der Gruppe der sonstigen Materialien (17,4 % vs. 4,4 %). Der prozentuale Anteil der Aortenklappen war in der Gruppe der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben signifikant höher, wohingegen die Anteile der Mitralklappen und der sonstigen Materialien in der Gruppe der 16S-rDNA-PCR-negativen Proben signifikant höher waren.

Im Rahmen der Gram-Färbung des Probenmaterials wurden bei 16S-rDNA-PCR-positiven Proben signifikant häufiger sowohl Bakterien als auch Granulozyten nachgewiesen (13,2 % vs. 0,4 % bzw. 27,3 % vs. 10,4 %). Das gleichzeitige Auftreten beider Befunde war mit insgesamt drei Fällen sehr selten und entzog sich somit der statistischen Auswertung.

Analog zu den Ergebnissen der Mikroskopie führte auch die kulturelle Anzucht von 16S-rDNA-PCR-positivem Probenmaterial auf Festmedien zu signifikant häufigerem Wachstum von Bakterienkolonien (71,1 % vs. 4,9 %), wohingegen die Kultur nach Anreicherung mithilfe von Flüssigmedien signifikant häufiger bei 16S-rDNA-PCR-negativen Proben positiv ausfiel (28,9 % vs. 95,1 %).

Blutkulturen wurden signifikant häufiger bei Patienten durchgeführt, deren bioptisches Material 16S-rDNA-PCR-positiv war (62,0 % vs. 30,9 %). Der blutkulturelle Nachweis von Erregern gelang dabei signifikant häufiger bei Patienten mit 16S-rDNA-PCR-positiven Biopsien (48,0 % vs. 29,8 %).

## 4.2 Kultureller Nachweis

### 4.2.1 Ergebnisse der Kultur des bioptischen Materials in den jeweiligen Altersgruppen

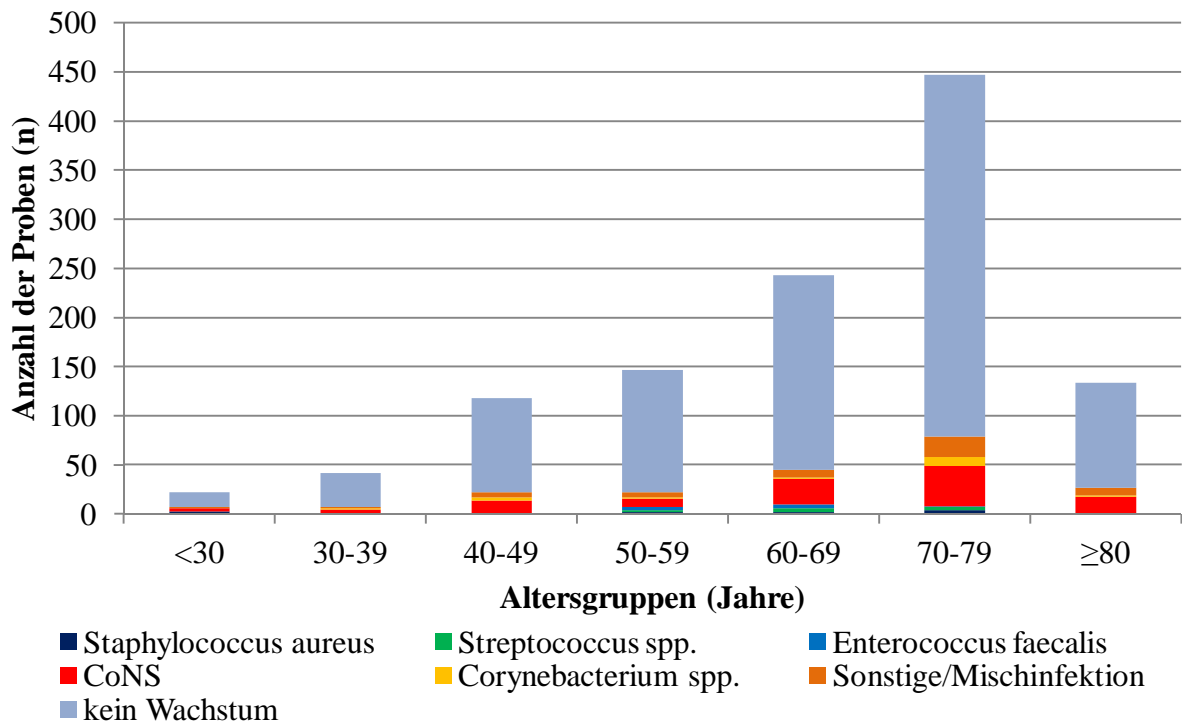


Abb. 2.1: Ergebnisse der Kultur des bioptischen Materials in den jeweiligen Altersgruppen (absolut).

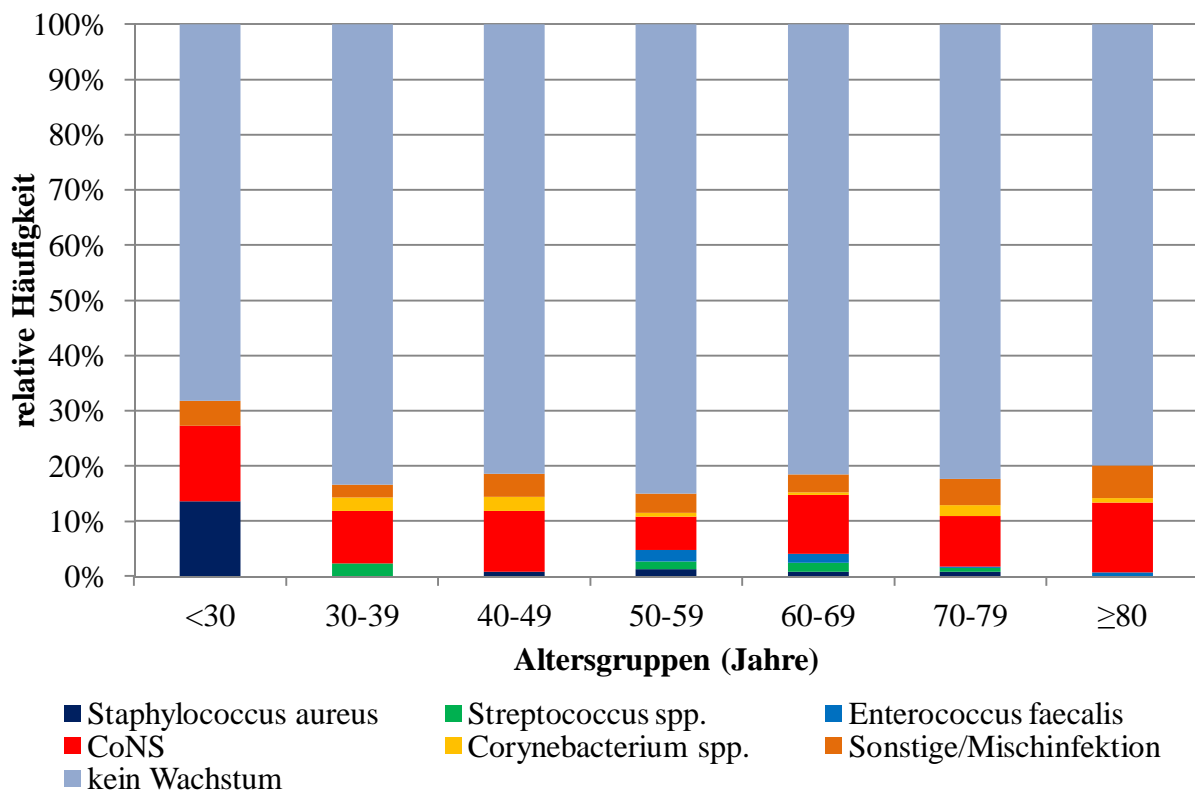


Abb. 2.2: Ergebnisse der Kultur des bioptischen Materials in den jeweiligen Altersgruppen (prozentuale Anteile).

Die Ergebnisse der Kultur des bioptischen Materials in den jeweiligen Altersgruppen (Abb. 2.1) zeigen eine Zunahme der absoluten Zahlen der mikrobiologisch untersuchten Biopsien ausgehend von einem absoluten Minimum in der Altersgruppe der unter 30-Jährigen (n = 22) bis zu einem absoluten Maximum in der Gruppe der 70- bis 79-Jährigen (n = 447).

Anschließend kommt es zu einem Abfall der Anzahl der Proben auf ein relatives Minimum in der Gruppe der über 80-Jährigen (n = 134).

In allen Altersgruppen ist grundsätzlich ein deutliches Überwiegen der Proben ohne Wachstum in Kultur festzustellen (n = 944 negative vs. n = 209 positive Proben). Die relative Häufigkeit positiver Befunde weist ein Maximum von knapp über 30 % in der Altersgruppe bis 30 Jahren auf (Abb. 2.2). Die höheren Altersgruppen hingegen zeigen abgesehen von kleineren Fluktuationen eine weitgehend gleichbleibende relative Häufigkeit positiver Befunde im Bereich zwischen 15 und 20 %.

Innerhalb der Gruppe der Proben mit positivem kulturellem Erregernachweis ist ein in allen Altersgruppen vorherrschendes Überwiegen von klassischen Hautkeimen nachweisbar (n = 178/209). Der Anteil dieser Gruppe von Erregern an der Gesamtzahl der untersuchten Proben wies in keiner Altersgruppe einen signifikanten Unterschied zum Gesamtanteil dieser Gruppe an allen kulturell untersuchten Proben über alle Altersgruppen hinweg auf.

#### 4.2.2 Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur in den jeweiligen Altersgruppen

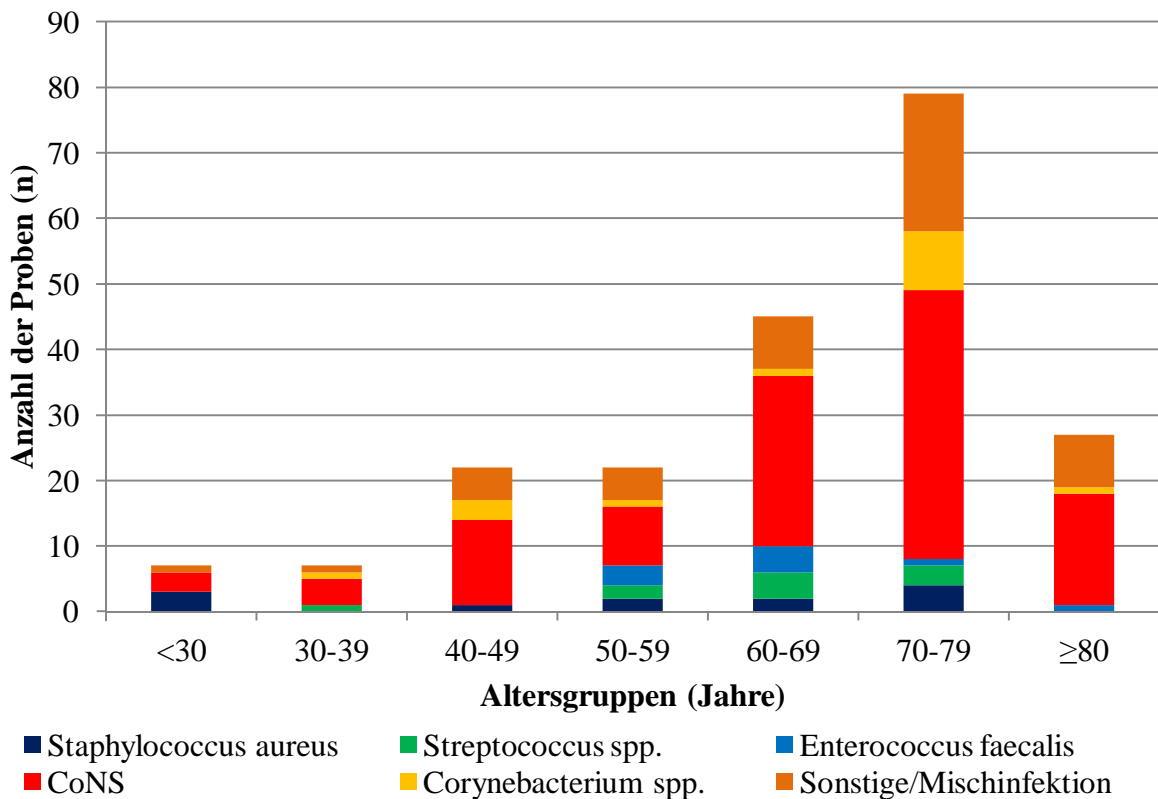


Abb. 2.3: Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur in den jeweiligen Altersgruppen (absolut).

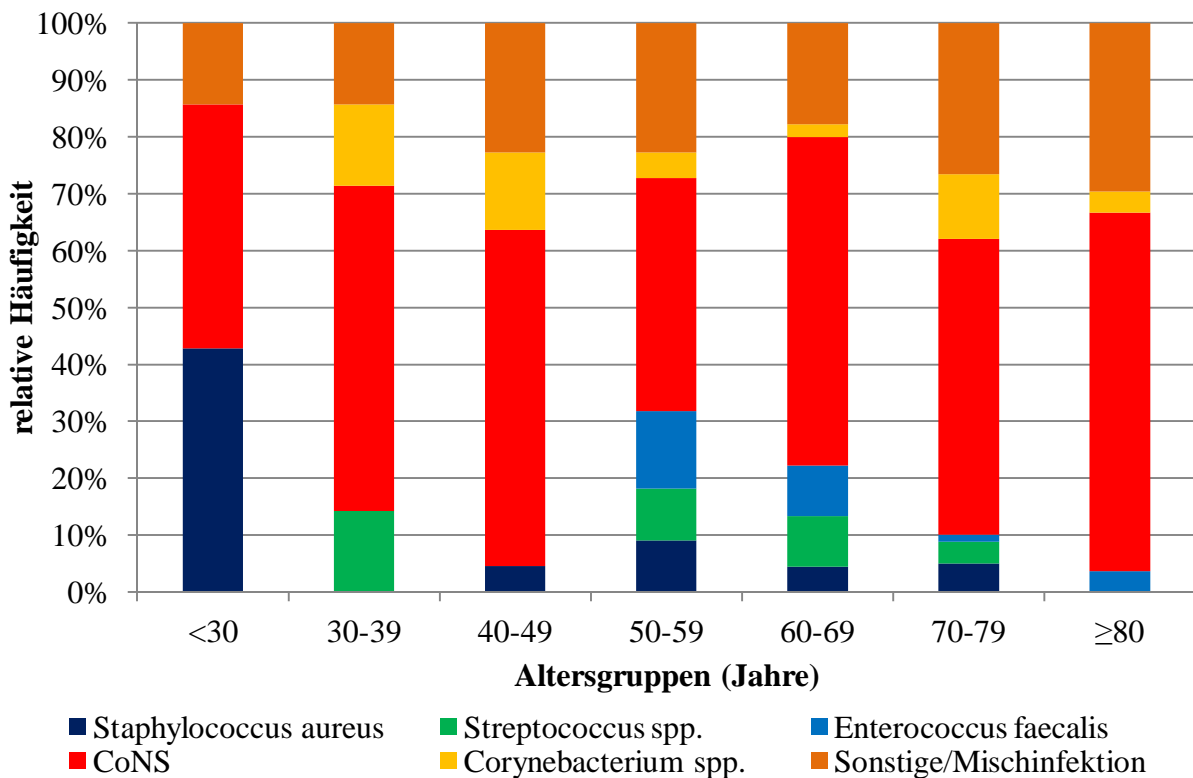


Abb. 2.4: Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur in den jeweiligen Altersgruppen (prozentuale Anteile).

Die Auswertung des Erregerspektrums der Proben mit positiver Kultur in den jeweiligen Altersgruppen zeigt eine Zunahme der Gesamtzahl der Proben mit positiver Kultur ausgehend von einem absoluten Minimum in den Altersgruppen der unter 30- und 30- bis 39-Jährigen (n = 7 bzw. 7) bis zu einem absoluten Maximum in der Altersgruppe der 70- bis 79-Jährigen (n = 79), gefolgt von einem Abfall auf ein relatives Minimum in der Gruppe der über 80-Jährigen (n = 27).

Der Vergleich der Gruppe der typischen Erreger der Endokarditis mit der Gruppe der klassischen Hautkeime zeigt für erstere einen zweigipfligen Verlauf der absoluten Häufigkeit des Nachweises mit einem relativen Maximum in der Altersgruppe der unter 30-Jährigen (n = 3/7) und einem absoluten Maximum in der Altersgruppe der 60- bis 69-Jährigen (n = 10/45), flankiert von Altersgruppen mit ebenfalls deutlich erhöhten Nachweiszahlen. Diese zweigipflige Verteilung ist auch in der Darstellung der relativen Häufigkeiten beider Erregergruppen zu finden (Abb. 2.4). Insgesamt beläuft sich der Anteil der typischen Erreger der Endokarditis bezogen auf die Gesamtzahl der positiven Befunde nur auf 14,8 %, jedoch sind für die unterschiedlichen Spezies unterschiedliche altersgruppenspezifische Verteilungen nachweisbar: Bei unter 30-jährigen Patienten wurde ausschließlich *Staphylococcus aureus* nachgewiesen. Auch in höheren Altersgruppen war dieser Erreger meist vertreten, jedoch spielen hier auch *Streptococcus spp.* als weitere typische Erreger der Endokarditis eine Rolle. *Enterococcus faecalis* konnte erstmals in der Altersgruppe der 50- bis 59-Jährigen angezüchtet werden und blieb als einziger Vertreter dieser Erregergruppe bis in die Gruppe der über 80-Jährigen nachweisbar.

Die Gruppe der klassischen Hautkeime zeigt mit Ausnahme der Altersgruppe der 50- bis 59-Jährigen eine konstante Zunahme der absoluten Nachweiszahlen bis in die Altersgruppe der 70- bis 79-Jährigen (n = 71/79), gefolgt von einem Abfall der Zahlen auf ein relatives Minimum. Diese Gruppe von Erregern macht dabei über alle Altersgruppen hinweg – mit einem maximalen altersgruppenspezifischen Anteil von über 95 % in den Altersgruppen der 40- bis 49-Jährigen und der über 80-Jährigen – den Großteil der kulturpositiven Ergebnisse aus (Abb. 2.3). Dabei stellen koagulasenegative Staphylokokken in allen Altersgruppen mit einem Anteil von 63,5 % die größte Fraktion innerhalb dieser Gruppe dar, gefolgt von Sonstigen/Mischinfektionen (27,5 %) und *Corynebacterium spp.* (9,0 %). Eine statistisch signifikante altersabhängige Veränderung des Gesamtanteils der typischen Erreger der Endokarditis bzw. der klassischen Hautkeime konnte nicht nachgewiesen werden.



### 4.2.3 Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur auf Festmedien in den jeweiligen Altersgruppen

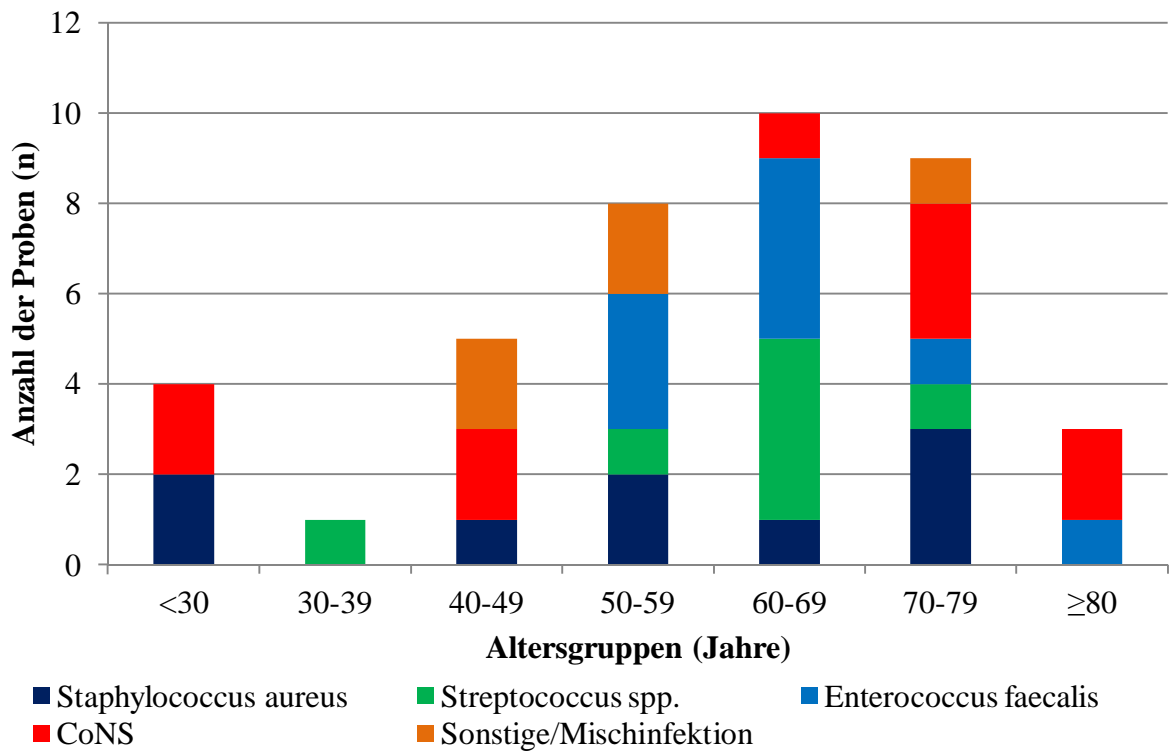


Abb. 3.1: Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur auf Festmedien in den jeweiligen Altersgruppen (absolut).

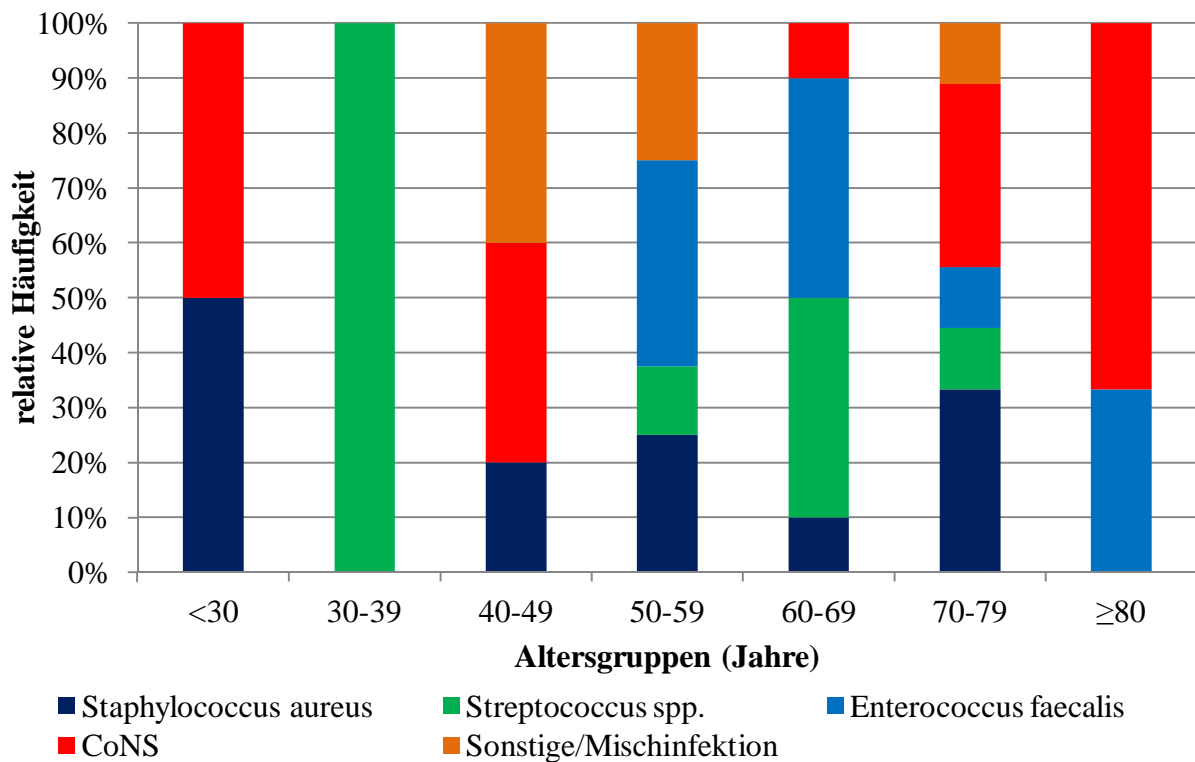


Abb. 3.2: Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur auf Festmedien in den jeweiligen Altersgruppen (prozentuale Anteile).

Der Fokus auf die Ergebnisse des Erregerspektrums der Proben mit positiver Kultur auf Festmedien ohne Anreicherungskultur mit Flüssigmedien in den jeweiligen Altersgruppen zeigt erneut einen zweigipfligen Verlauf der absoluten Zahlen des Erregernachweises mit einem relativen Maximum in der Altersgruppe der unter 30-Jährigen ( $n = 4$ ) und einem absoluten Maximum in der Altersgruppe der 60- bis 69-Jährigen ( $n = 10$ ), gefolgt von einem relativen Minimum in der Gruppe der über 80-Jährigen ( $n = 3$ ) (Abb. 3.1).

Nach Ausschluss der Ergebnisse der Kultur mit Flüssigmedien ist ein Anstieg des Anteils der typischen Endokarditiserreger an der Gesamtzahl der positiven Kulturen auf 62,5 % zu verzeichnen. Dennoch konnte über alle Altersgruppen hinweg in 15 von 40 Fällen der Nachweis von Hautkeimen geführt werden, unter denen der Fraktion der koagulasenegativen Staphylokokken mit insgesamt zehn nachgewiesenen Fällen die größte Bedeutung zukam.

#### 4.2.4 Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur in Flüssigmedien in den jeweiligen Altersgruppen

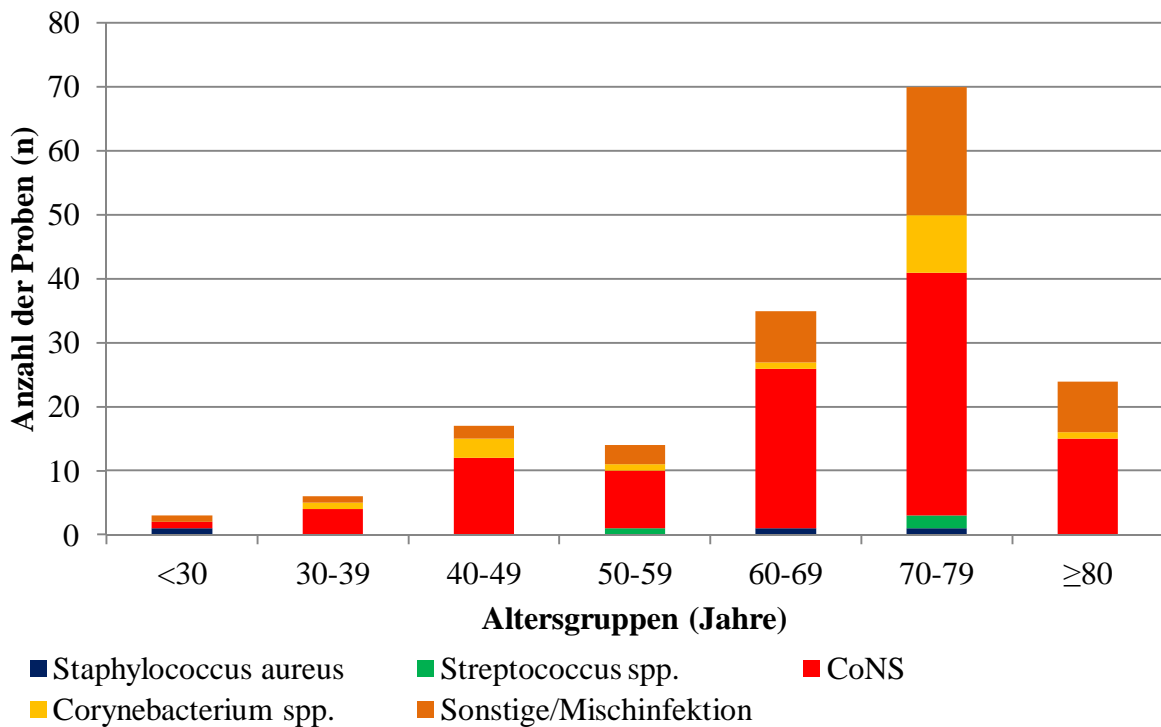


Abb. 4.1: Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur in Flüssigmedien in den jeweiligen Altersgruppen (absolut).

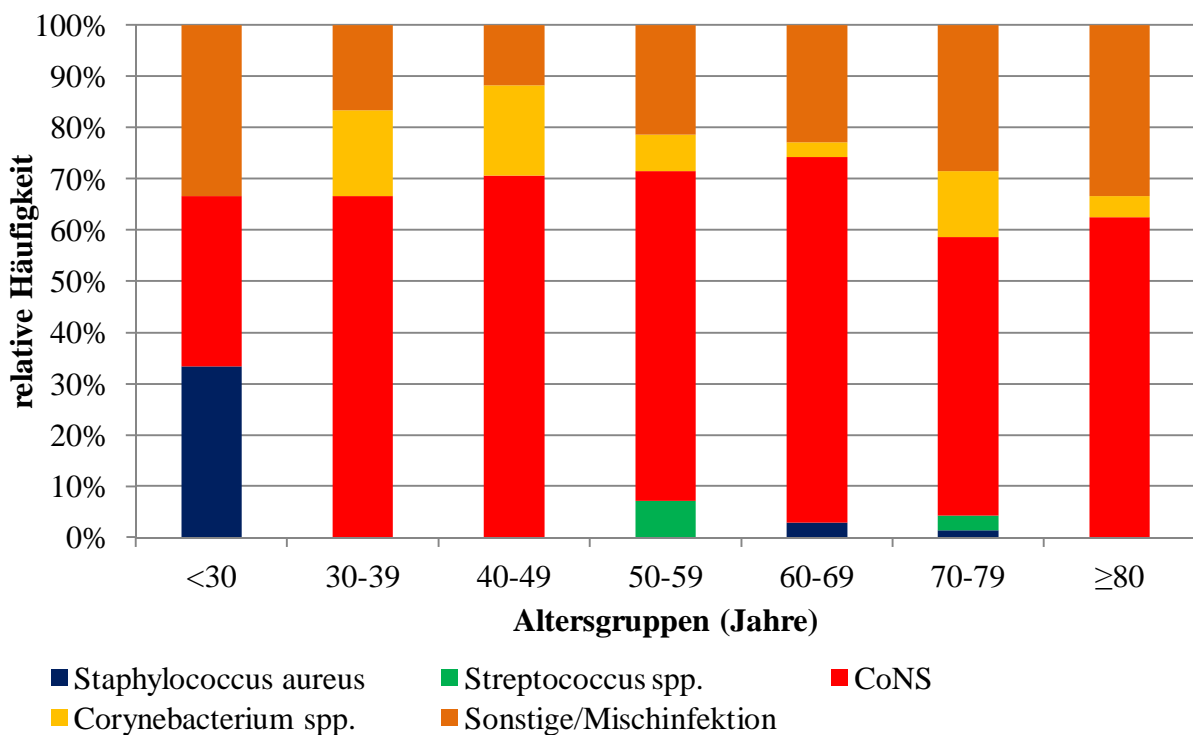


Abb. 4.2: Erregerspektrum der Proben mit positiver Kultur in Flüssigmedien in den jeweiligen Altersgruppen (prozentuale Anteile).

Die Auswertung der Proben mit positiver Kultur in Flüssigmedien zeigt mit Ausnahme eines leichten Rückgangs in der Gruppe der 50- bis 59-Jährigen eine Zunahme der Anzahl der Proben mit positivem Erregernachweis ausgehend von einem absoluten Minimum in der Altersgruppe der unter 30-Jährigen (n = 3) bis zum Erreichen eines Maximums in der Gruppe der 70- bis 79-Jährigen (n = 70), an welches sich ein relatives Minimum in der Gruppe der über 80-Jährigen anschließt (n = 24) (Abb. 4.1).

Das Erregerspektrum wird über alle Altersgruppen hinweg von typischen Vertretern der Gruppe der Hautkeime dominiert, die mit Ausnahme der Altersgruppe der unter 30-Jährigen relative Häufigkeiten zwischen 93 und 100 % erreichen. Der Gesamtanteil an allen positiven Befunden sämtlicher Altersgruppen beläuft sich dabei auf 96,4 %. Innerhalb dieser Gruppe von Erregern stellen koagulasenegative Staphylokokken die am stärksten vertretene Fraktion dar (n = 104), gefolgt von Sonstigen/Mischinfektionen (n = 43) und *Corynebacterium spp.* (n = 16). Innerhalb der Gruppe der typischen Erreger der Endokarditis kam es sporadisch zum Nachweis von *Staphylococcus aureus* (n = 3) und *Streptococcus spp.* (n = 3). Der statistische Vergleich der Erregerspektren der kulturellen Anzucht von bioptischem Material auf Festmedien und mittels Flüssigmedien konnte einen signifikant häufigeren Nachweis von klassischen Hautkeimen im Rahmen der Anreicherungskultur mittels Flüssigmedien bzw. von typischen Endokarditis-Erregern im Rahmen der Kultur auf Festmedien belegen.

### 4.3 16S-rDNA-PCR und Sequenzierung

#### 4.3.1 Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR in den jeweiligen Altersgruppen

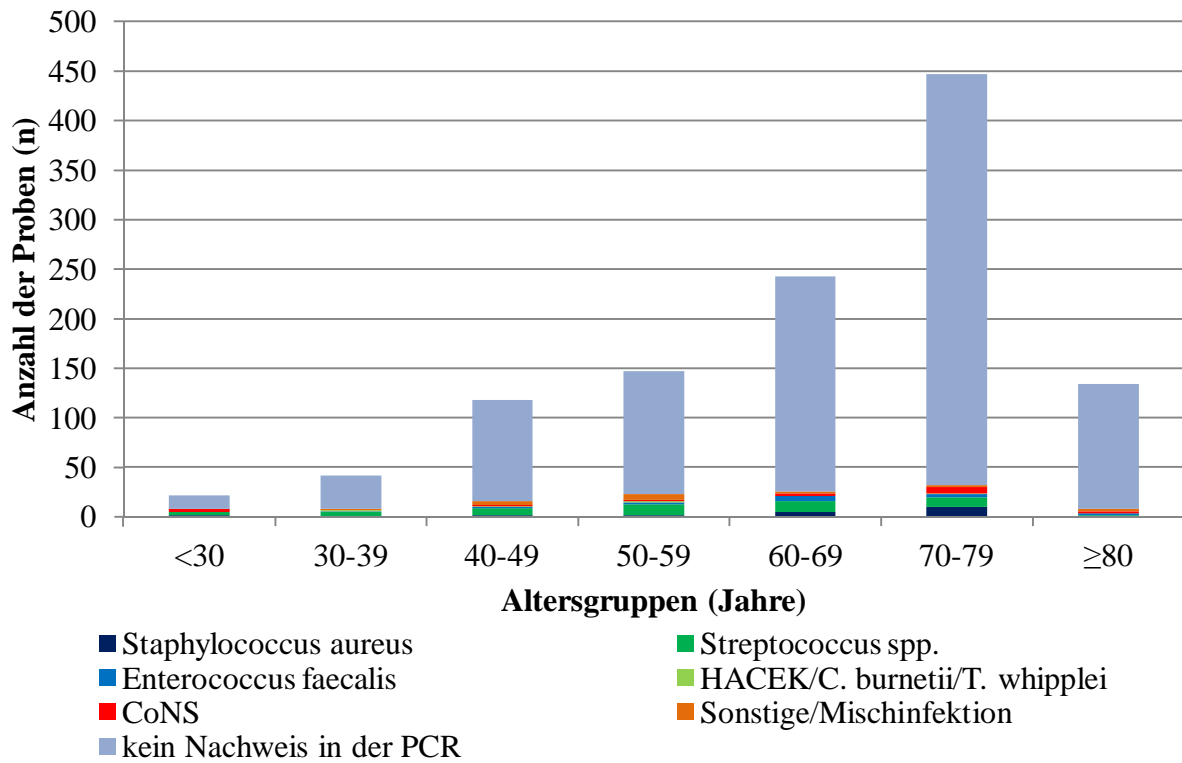


Abb. 5.1: Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR in den jeweiligen Altersgruppen (absolut).

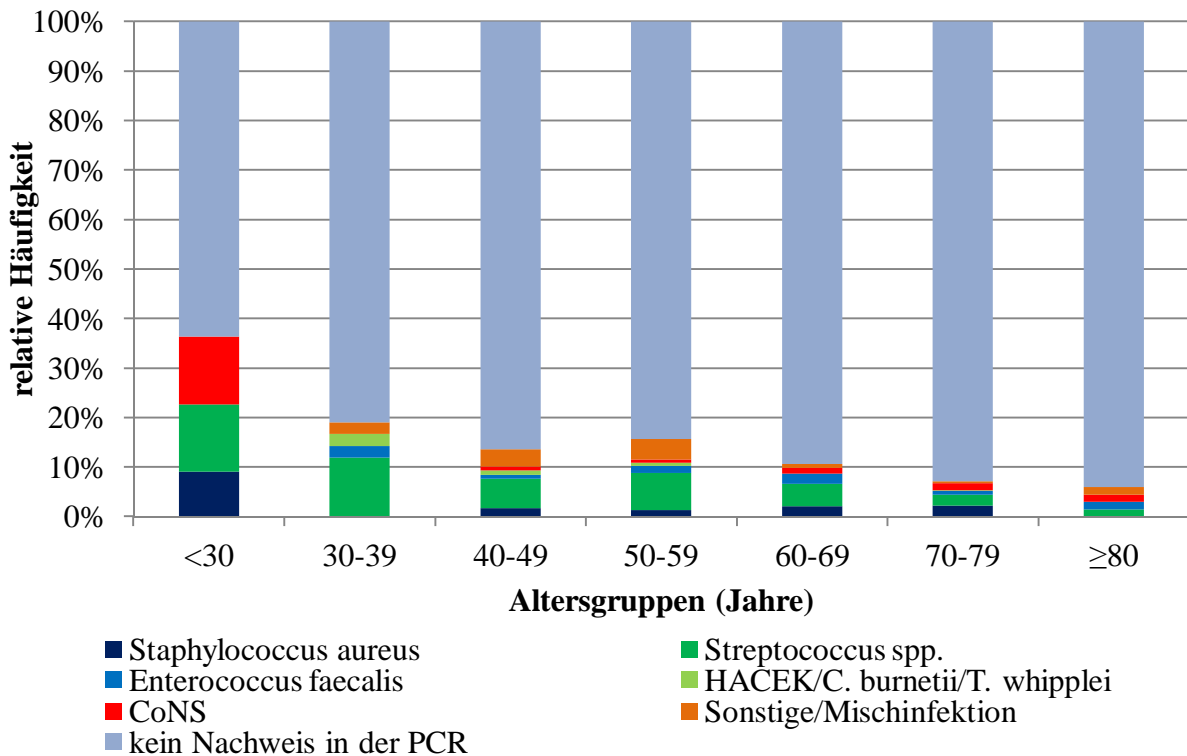


Abb. 5.2: Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR in den jeweiligen Altersgruppen (prozentuale Anteile).

Die Auswertung der 16S-rDNA-PCR in den jeweiligen Altersgruppen zeigt in Analogie zu den Ergebnissen der kulturellen Anzucht des bioptischen Materials eine Zunahme der absoluten Anzahl der mittels 16S-rDNA-PCR untersuchten Biopsien ausgehend von einem absoluten Minimum in der Altersgruppe der unter 30-Jährigen (n = 22) bis zum Erreichen eines absoluten Maximums in der Gruppe der 70- bis 79-Jährigen (n = 447) mit nachfolgendem Abfall der Zahl auf ein relatives Minimum in der Gruppe der über 80-Jährigen (n = 134) (Abb. 5.1).

In allen Altersgruppen ist ein deutliches Überwiegen der Proben mit 16S-rDNA-PCR-negativem Befund festzustellen (n = 1032/1153). Dabei fällt der Anteil der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben am Gesamtprobenumfang von einem absoluten Maximum von 36 % in der Altersgruppe der unter 30-Jährigen kontinuierlich auf ein absolutes Minimum von 6 % in der Gruppe der über 80-Jährigen ab (Abb. 5.2).

### 4.3.2 Erregerspektrum der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben in den jeweiligen

#### Altersgruppen

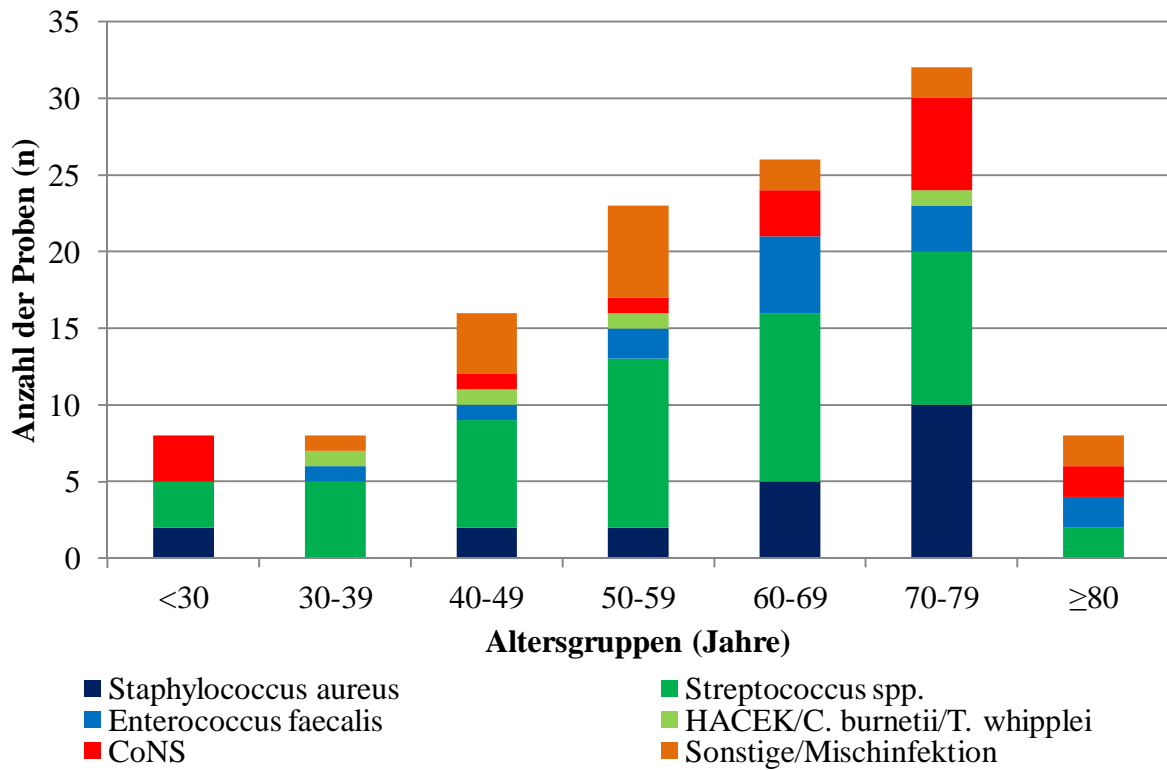


Abb. 5.3: Erregerspektrum der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben in den jeweiligen Altersgruppen (absolut).

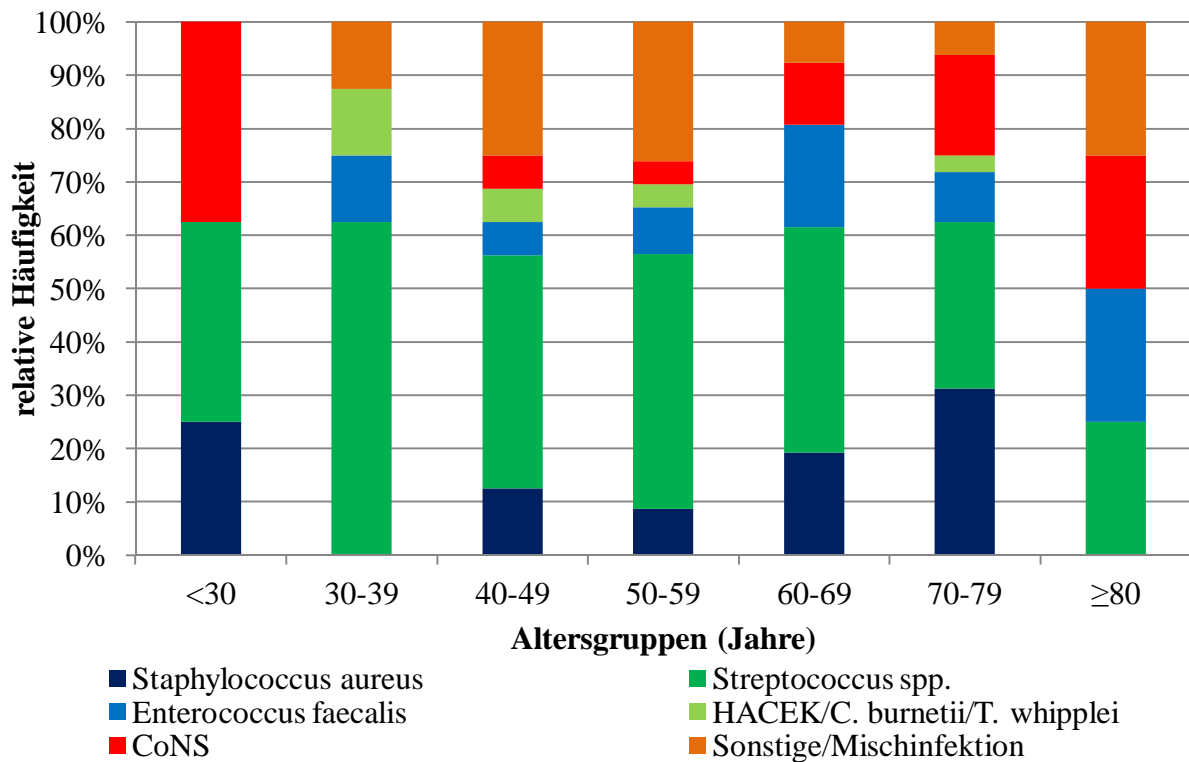


Abb. 5.4: Erregerspektrum der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben in den jeweiligen Altersgruppen (prozentuale Anteile).

Die Auswertung des Erregerspektrums der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben in den jeweiligen Altersgruppen zeigt eine Zunahme der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben ausgehend von einem absoluten Minimum in den Altersgruppen der unter 30- und 30- bis 39-Jährigen (n = 8 bzw. 8) bis zum Erreichen eines absoluten Maximums in der Altersgruppe der 70- bis 79-Jährigen (n = 32), gefolgt von einem weiteren absoluten Minimum in der Altersgruppe der über 80-Jährigen (n = 8) (Abb. 5.3).

Das Erregerspektrum der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben wird quantitativ von typischen Endokarditis-Erregern dominiert (n = 88/121 positiven Proben). Der Anteil dieser Gruppe von Erregern schwankt dabei zwischen minimal 50 % in der Altersgruppe der über 80-Jährigen und maximal 87,5 % in der Altersgruppe der 30- bis 39-Jährigen. Der durchschnittliche Anteil über alle Altersgruppe hinweg beträgt 72,7 % (Abb. 5.4). Innerhalb dieser Gruppe von Erregern spielen *Streptococcus spp.* die größte Rolle (n = 49), gefolgt von *Staphylococcus aureus* (n = 21) und *Enterococcus faecalis* (n = 14). Mithilfe der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung konnten auch Erreger aus der Gruppe der schwer anzüchtbaren typischen Endokarditis-Erreger nachgewiesen werden (n = 4). Klassische Hautkeime und Mischinfektionen spielen quantitativ eine untergeordnete Rolle, sind aber in allen Altersgruppen nachweisbar (n = 33) (Abb. 5.3).

Eine statistisch signifikante altersabhängige Veränderung des Gesamtanteils der typischen Erreger der Endokarditis bzw. der klassischen Hautkeime konnte nicht nachgewiesen werden.



## 4.4 Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR mit denen der konventionellen Verfahren

### 4.4.1 Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR mit denen der Kultur

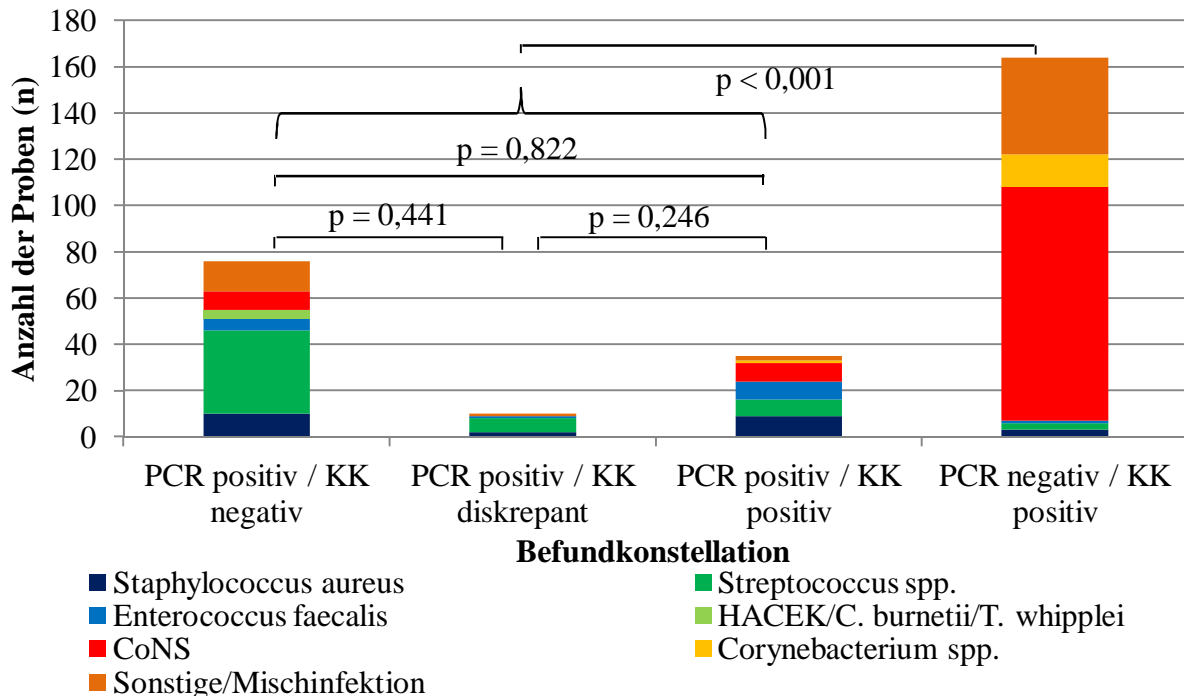


Abb. 6.1: Vergleich der Ergebnisse der PCR mit denen der konventionellen Kultur (absolut). KK = konventionelle Kultur. Bei der Befundkonstellation "PCR positiv / KK diskrepant" wurde das Erregerspektrum der PCR dargestellt.

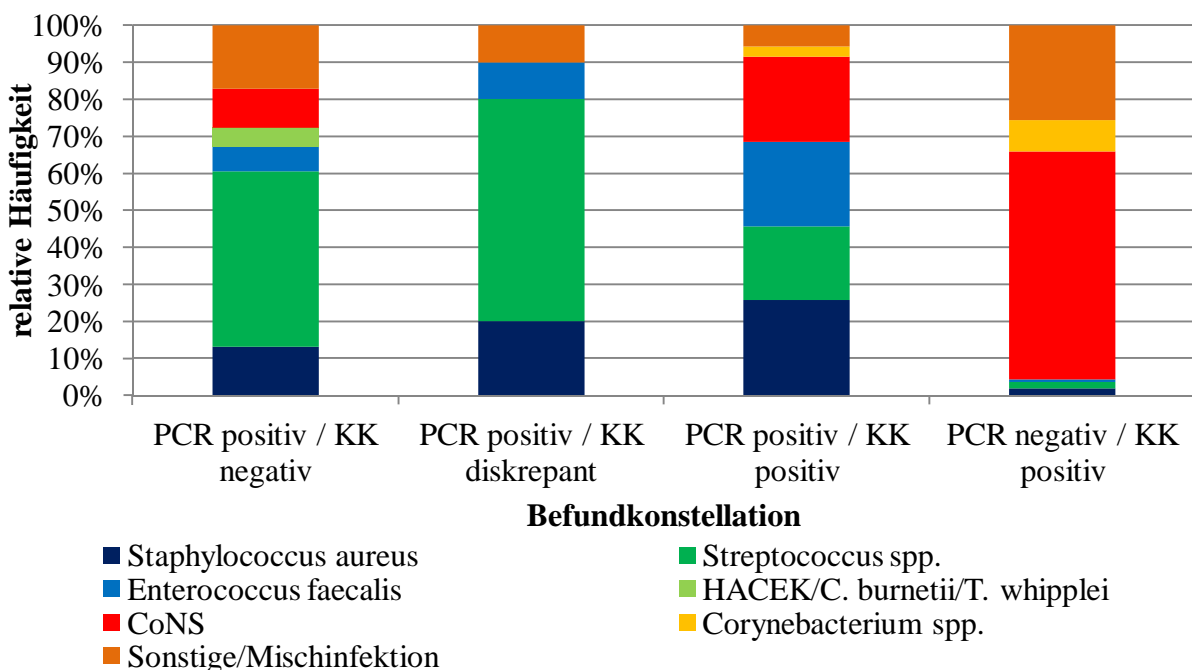


Abb. 6.2: Vergleich der Ergebnisse der PCR mit denen der konventionellen Kultur (prozentuale Anteile). KK = konventionelle Kultur. Bei der Befundkonstellation "PCR positiv / KK diskrepant" wurde das Erregerspektrum der PCR dargestellt.

Der Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR mit denen der kulturellen Anzucht des bioptischen Materials stellt die Erregerspektren der unterschiedlichen Befundkonstellationen dar. Bei den 16S-rDNA-PCR-positiven Konstellationen spielen dabei stets die typischen Erreger der Endokarditis die quantitativ bedeutendste Rolle mit einem Anteil am Gesamtprobenumfang von bis zu 90 % in der Gruppe der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben mit diskrepantem Befund in der Kultur des bioptischen Materials (Abb. 6.2). Innerhalb dieser Erregergruppe waren *Streptococcus spp.* am häufigsten vertreten (n = 49/121), gefolgt von *Staphylococcus aureus* (n = 21/121) und *Enterococcus faecalis* (n = 14/121). Seltene typische Erreger der Endokarditis konnten ausschließlich mithilfe der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung nachgewiesen werden (n = 4). Zwischen den unterschiedlichen 16S-rDNA-PCR-positiven Befundkonstellationen gab es hinsichtlich des Anteils typischer Endokarditiserreger bzw. klassischer Hautkeime am jeweiligen Gesamtprobenumfang keine signifikanten Unterschiede. 16S-rDNA-PCR-negative Proben mit positivem Befund im Rahmen der konventionellen Kultur waren mit 164 Fällen insgesamt deutlich häufiger vertreten als Proben sämtlicher 16S-rDNA-PCR-positiver Befundkonstellationen (n = 121) und fallen durch den signifikant häufigeren Nachweis von klassischen Hautkeimen im Vergleich mit den kumulativen Werten für alle 16S-rDNA-PCR-positiven Befundkonstellationen auf (61,6 % vs. 27,3 %). Innerhalb der Gruppe der klassischen Hautkeime waren koagulasenegative Staphylokokken die quantitativ wichtigste Fraktion (n = 101/164), gefolgt von Mischinfektionen und sonstigen Erregern (n = 42/164) und *Corynebacterium spp.* (n = 14/164).

#### 4.4.2 Darstellung des Anreicherungsstatus für unterschiedliche Befundkonstellationen

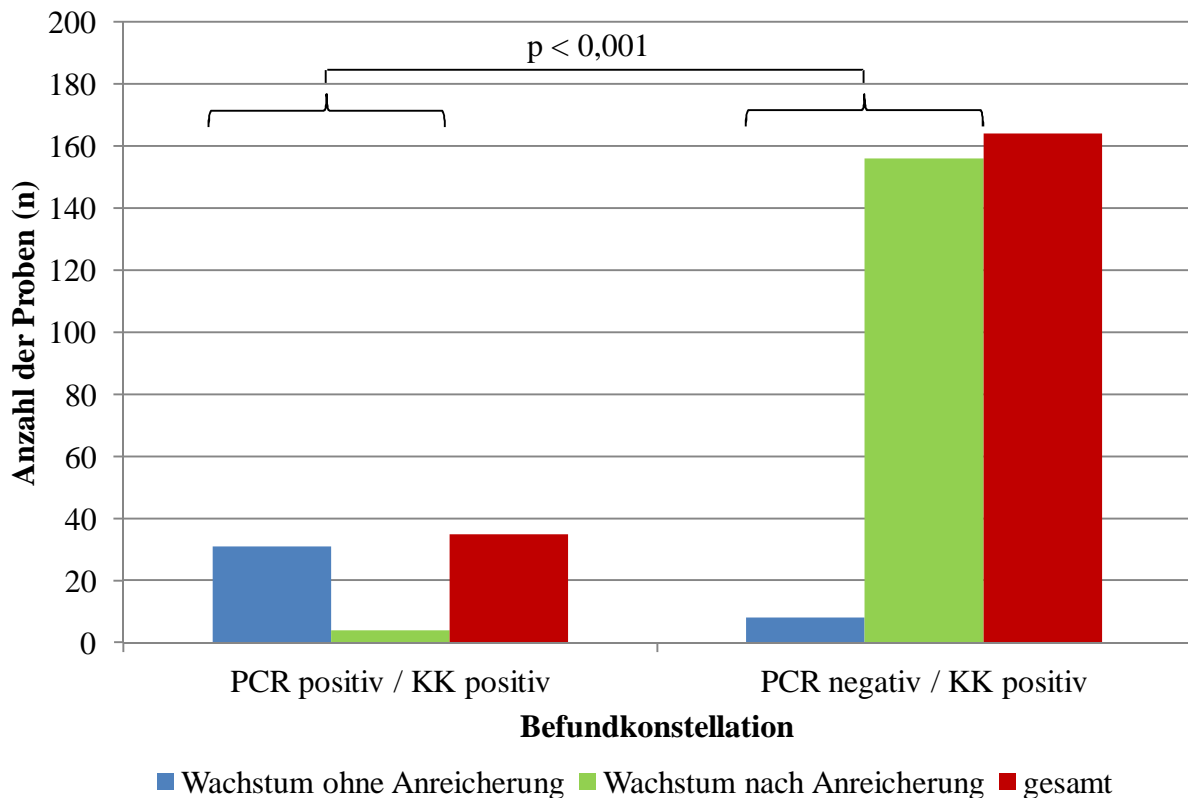


Abb. 7: Darstellung des Anreicherungsstatus der Kultur des bioptischen Materials für PCR-positive/kulturpositive Proben und PCR-negative/kulturpositive Proben. KK = konventionelle Kultur.

Die Auswertung des Anreicherungsstatus der positiven Kulturen des bioptischen Materials bei 16S-rDNA-PCR-positivem bzw. -negativem Befund zeigt, dass bei negativem Ergebnis der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung der Erregernachweis mittels Kultur signifikant häufiger erst im Rahmen der Anreicherungskultur in Flüssigmedien gelungen ist, wohingegen bei 16S-rDNA-PCR-positivem Befund die Kultur in der Regel bereits auf Festmedien einen Keimnachweis erbrachte (Abb. 7).

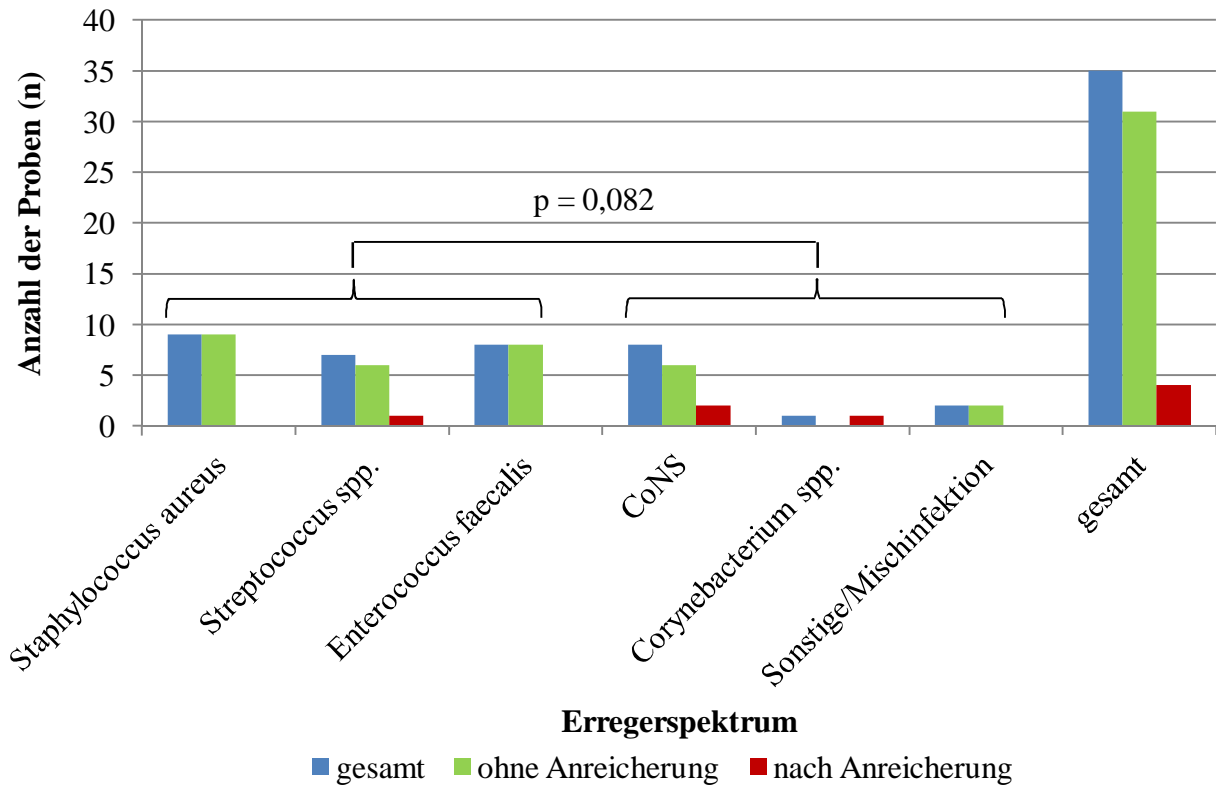


Abb. 8.1: Darstellung des Anreicherungsstatus für PCR-positive/kulturpositive Proben.

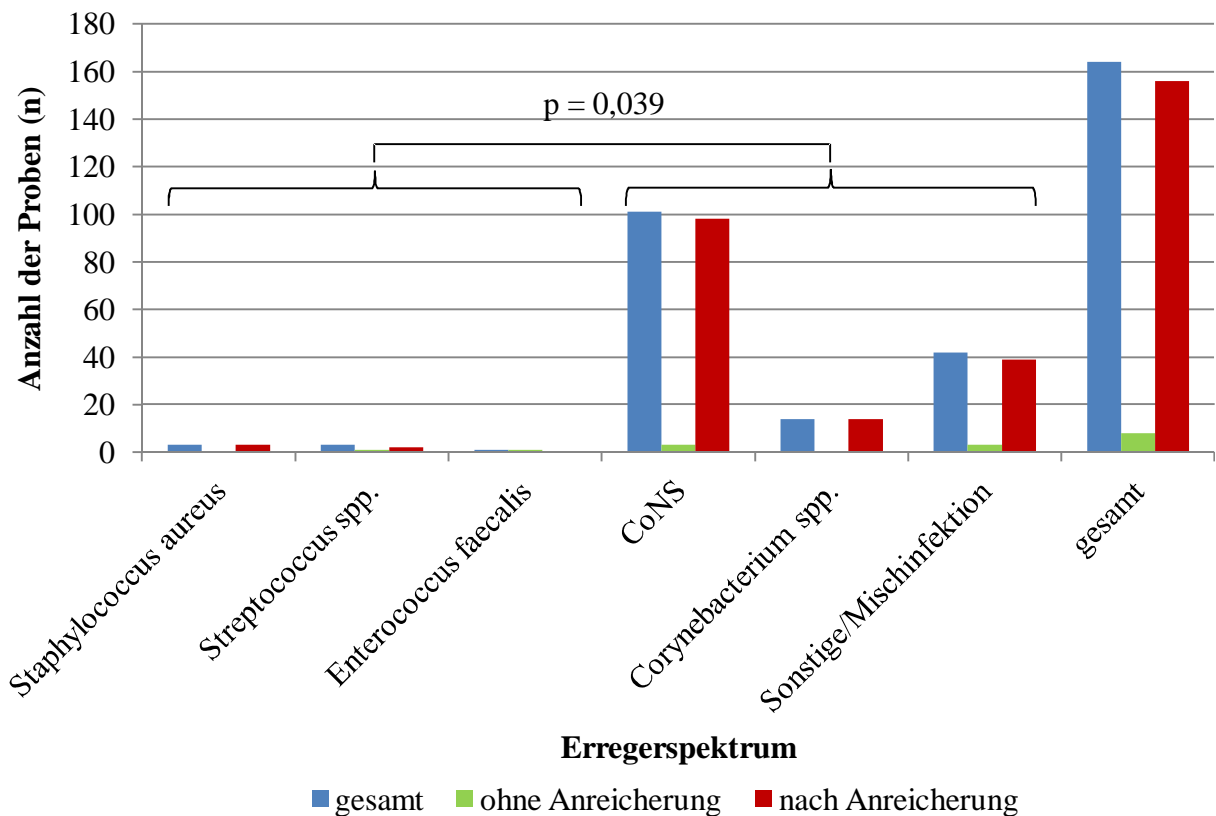


Abb. 8.2: Darstellung des Anreicherungsstatus für PCR-negative/kulturpositive Proben.

Die Auswertung des Erregerspektrums in Abhängigkeit vom Anreicherungsstatus der Kultur für Proben mit identischem Keimnachweis im Rahmen der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung und Kultur zeigt insgesamt ein klares Überwiegen (89 %) des kulturellen Nachweises ohne Anreicherung mittels Festmedien gegenüber der Anreicherungskultur in Flüssigmedien. Lediglich in 11 % der Fälle führte erst die Anreicherungskultur zu einem mit dem Befund der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung übereinstimmenden kulturellen Ergebnis. Zwischen der Gruppe der typischen Endokarditis-Erreger und der Gruppe der klassischen Hautkeime gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied, was die Häufigkeit des Nachweises mittels Kultur ohne Anreicherung und mittels Anreicherungskultur anbelangt (Abb. 8.1).

Die Auswertung des Erregerspektrums in Abhängigkeit vom Anreicherungsstatus der kulturell positiven Proben mit negativem Befund im Rahmen der 16S-rDNA-PCR zeigt, dass bei der Mehrzahl der Proben (96 %) erst im Rahmen der Anreicherungskultur in Flüssigmedien der Erregernachweis erbracht werden konnte. Das Erregerspektrum rekrutierte sich dabei überwiegend aus klassischen Hautkeimen und Mischinfektionen (95,7 %). Innerhalb dieser Gruppe stellten die koagulasenegative Staphylokokken die quantitativ bedeutendste Fraktion dar. Vertreter der Gruppe der typischen Erreger der Endokarditis konnten nur sporadisch gefunden werden ( $n = 7$ ). Für die Gruppe der klassischen Hautkeime konnte der Nachweis im Vergleich mit der Gruppe der typischen Endokarditis-Erreger signifikant häufiger erst im Rahmen der Anreicherungskultur in Flüssigmedien geführt werden (Abb. 8.2).

#### 4.4.3 Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR mit denen der Kultur des bioptischen Materials und der Blutkultur

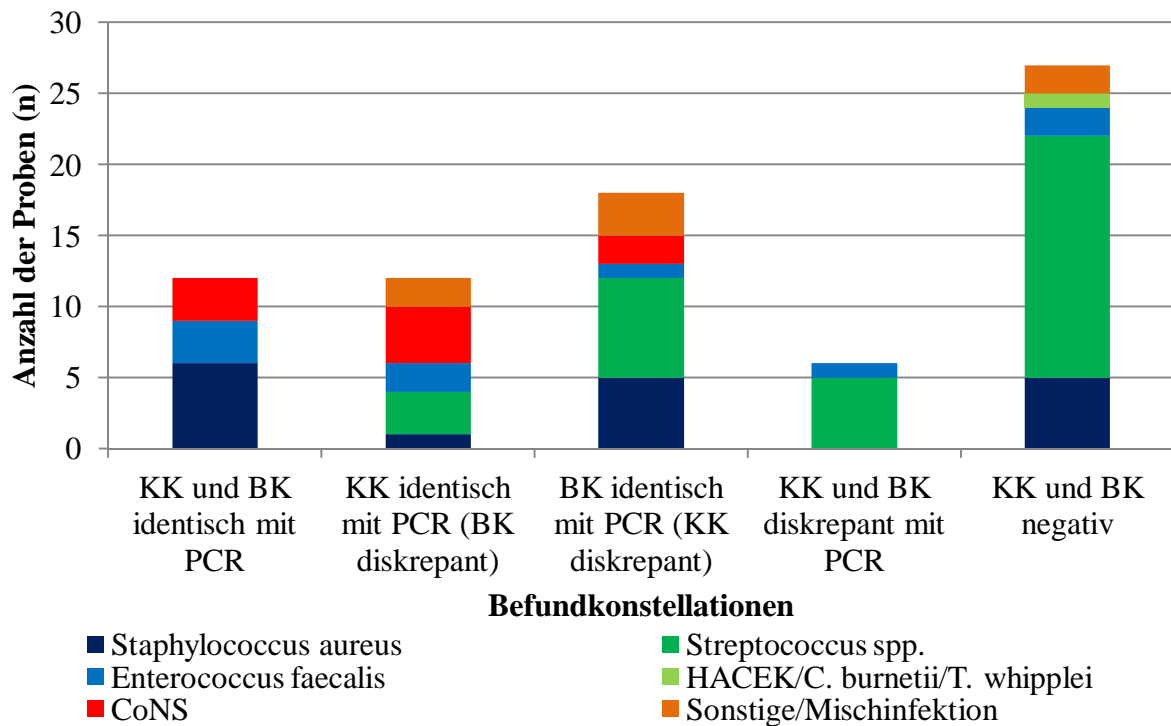


Abb. 9.1: Vergleich der Ergebnisse der PCR mit denen der Kultur des bioptischen Materials und der Blutkultur (absolut). BK = Blutkultur, KK = konventionelle Kultur des bioptischen Materials.

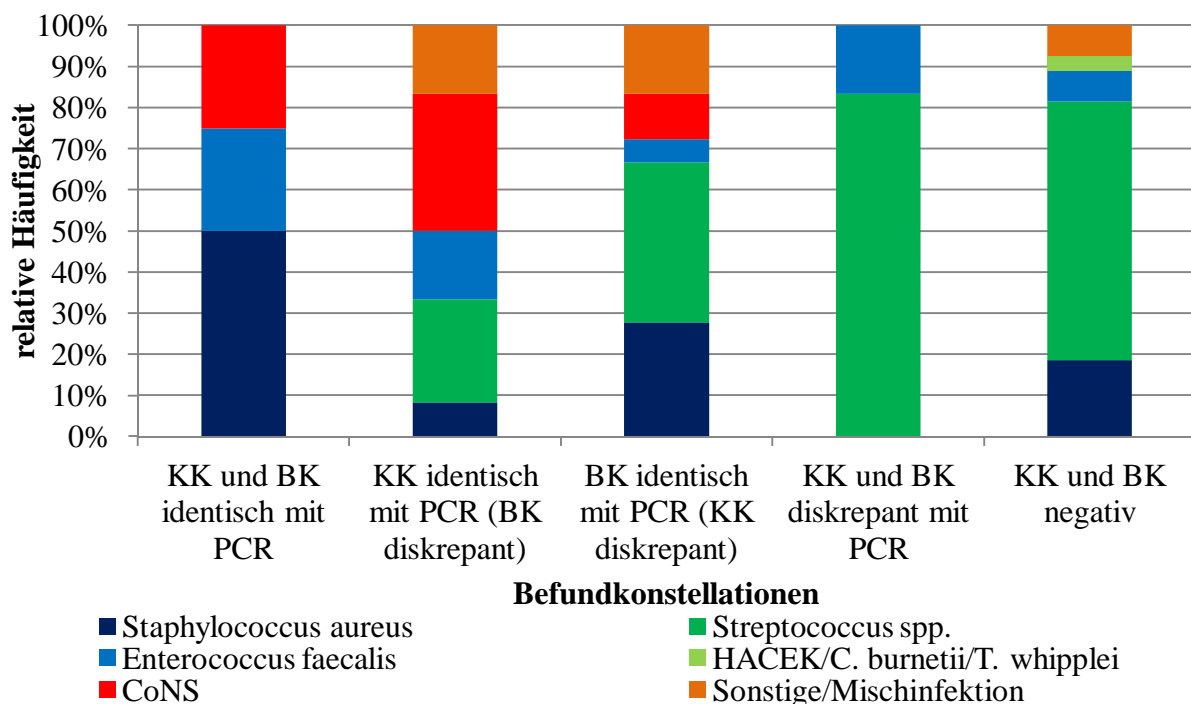


Abb. 9.2: Vergleich der Ergebnisse der PCR mit denen der Kultur des bioptischen Materials und der Blutkultur (prozentuale Anteile). BK = Blutkultur, KK = konventionelle Kultur des bioptischen Materials.

Der Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung mit denen der Kultur des bioptischen Materials und der Blutkultur zeigt, dass in zwölf bzw. 18 Fällen der Befund der Kultur des bioptischen Materials bzw. der Blutkultur identisch mit dem der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung war, wobei die jeweils andere konventionelle diagnostische Methode ein diskrepantes Ergebnis lieferte. Das Erregerspektrum dieser Befundkonstellationen wies sowohl Vertreter der typischen Erreger der Endokarditis als auch solche der Gruppe der klassischen Hautkeime auf.

Eine Diskrepanz zwischen allen drei diagnostischen Verfahren war in sechs Fällen gegeben. Hier wurden mithilfe der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung ausschließlich typische Erreger der Endokarditis nachgewiesen.

Bei 27 16S-rDNA-PCR-positiven Proben versagten sowohl die Kultur des bioptischen Materials als auch die Blutkultur komplett. Hier konnten in 93 % der Fälle typische Erreger der Endokarditis nachgewiesen werden, wobei auch ein Vertreter der Gruppe der seltenen typischen Erreger erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Komplette Übereinstimmung zwischen allen diagnostischen Methoden lag bei zwölf Proben vor. Neben *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis* wurden hier in drei Fällen auch koagulasenegative Staphylokokken nachgewiesen (Abb. 9.1).

#### 4.4.4 Darstellung des diagnostischen Benefits durch Anwendung der 16S-rDNA-PCR

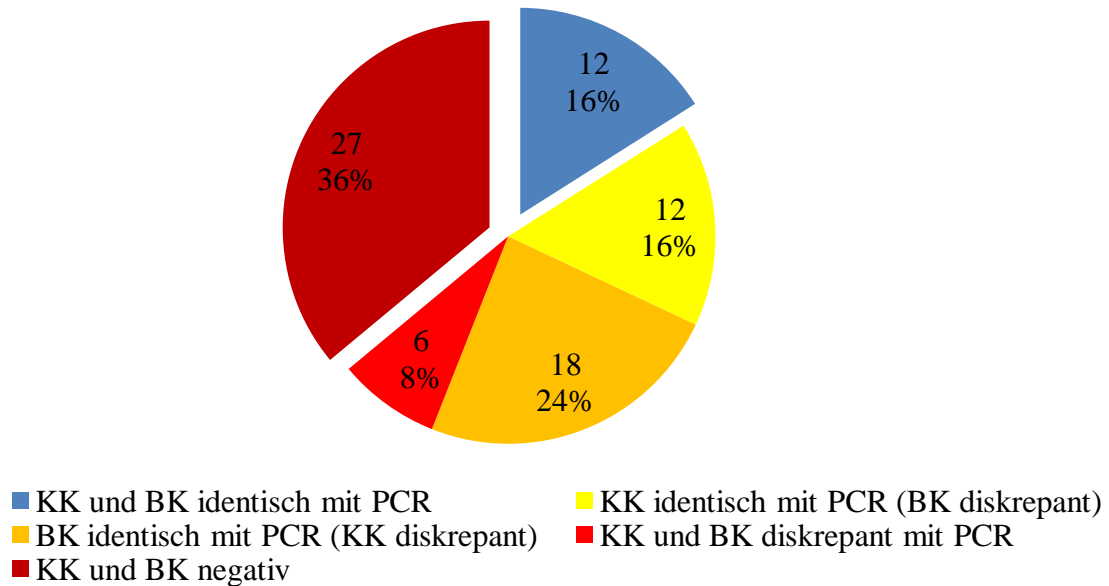


Abb. 10.1: Darstellung des diagnostischen Benefits durch PCR (Abbildung für PCR-positive Proben). BK = Blutkultur, KK = konventionelle Kultur des bioptischen Materials.

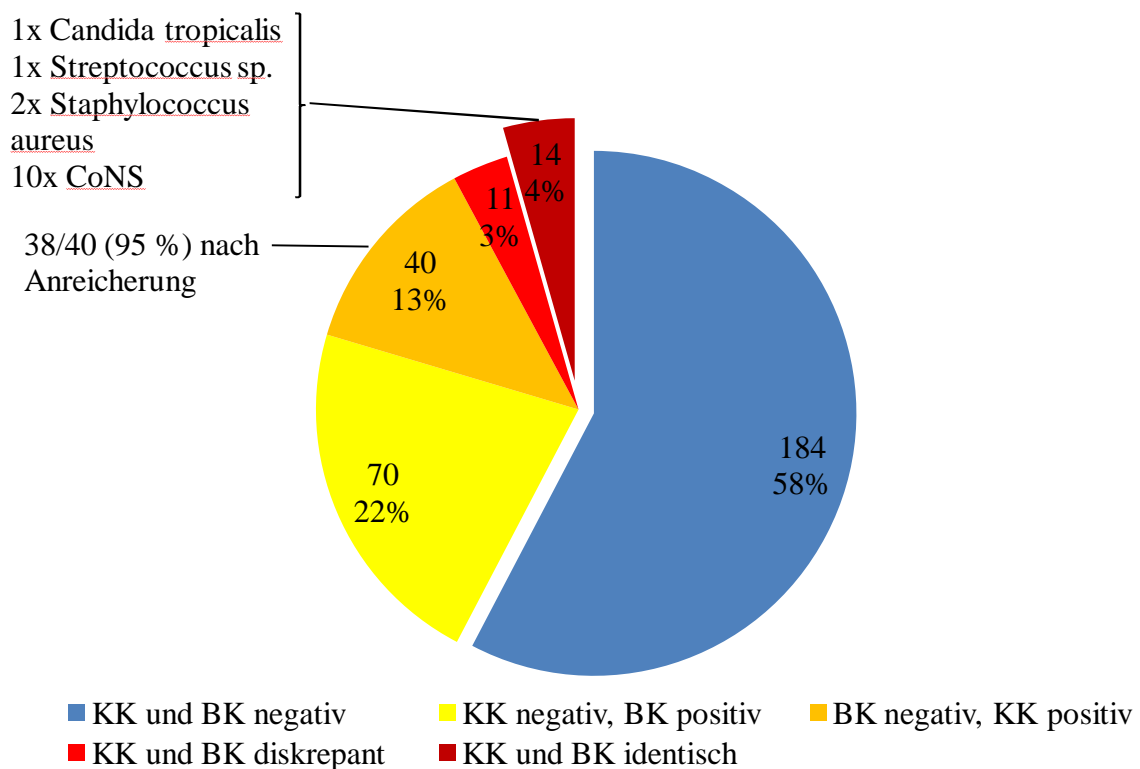


Abb. 10.2: Darstellung des diagnostischen Benefits durch PCR (Abbildung für PCR-negative Proben). BK = Blutkultur, KK = konventionelle Kultur des bioptischen Materials.



Die Auswertung der Übereinstimmung bzw. der Diskrepanz der Ergebnisse der molekularbiologischen Methoden und der konventionellen kulturbasierten Methoden des Erregernachweises zeigt, dass in der Gruppe der 16S-rDNA-PCR-positiven Proben in 16 % der Fälle (n = 12) ein identischer Erregernachweis im Rahmen der konventionellen Diagnostik durch die 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung bestätigt werden konnte. In insgesamt 40 % der Proben (n = 30) herrschte primär Diskrepanz zwischen der Kultur des bioptischen Materials und der Blutkultur, wobei das Ergebnis eines der Verfahren durch die 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung bestätigt wurde. In 8 % der Fälle (n = 6) bestand völlige Diskrepanz zwischen allen diagnostischen Methoden und schließlich konnte in 36 % der Fälle (n = 27) einzig mithilfe der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung der positive Erregernachweis geführt werden (Abb. 10.1).

Die 16S-rDNA-PCR-negativen Proben bestätigten in 58 % der Fälle (n = 184) die übereinstimmend negativen Befunde der konventionellen Diagnostik und in insgesamt 35 % der Fälle (n = 110) konnte das negative 16S-rDNA-PCR-Ergebnis den negativen Befund der Kultur des bioptischen Materials oder der Blutkultur bestätigen, wobei primär Diskrepanz mit dem positiven Erregernachweis des jeweils anderen konventionellen Verfahrens bestand. Innerhalb dieser Befundkonstellation war außerdem auffällig, dass bei übereinstimmend negativem Befund im Rahmen der Blutkultur und der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung und gleichzeitig positivem Keimnachweis mittels Kultur des bioptischen Materials 95 % der positiven Befunde auf Anreicherungskulturen in Flüssigmedien zurückzuführen waren. In weiteren 3 % der 16S-rDNA-PCR-negativen Proben (n = 11) herrschte Diskrepanz zwischen den positiven Ergebnissen der konventionellen Methoden und in 4 % (n = 14) standen dem negativen Befund der 16S-rDNA-PCR/Sequenzierung identische Ergebnisse der Kultur des bioptischen Materials und der Blutkultur gegenüber, wobei sich der in einem Fall kulturell nachgewiesene *Candida tropicalis* der Diagnostik mittels 16S-rDNA-PCR grundsätzlich entzieht (Abb. 10.2).

#### 4.4.5 Statistische Auswertung der diagnostischen Verfahren

Tab. 2: Statistische Auswertung der diagnostischen Verfahren (Referenz: interner Goldstandard\*).

|                                     | Sensitivität                 | Spezifität                   | Youden-Index |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------|
| PCR/Sequenzierung                   | 0,938<br>CI95% 0,878 – 0,971 | 1,0<br>CI95% 0,995 – 1,000   | 0,938        |
| Kultur (Gewebe) gesamt              | 0,333<br>CI95% 0,254 – 0,422 | 0,838<br>CI95% 0,814 – 0,860 | 0,171        |
| Kultur (Gewebe) auf Festmedien      | 0,302<br>CI95% 0,226 – 0,390 | 0,999<br>CI95% 0,994 – 0,999 | 0,301        |
| Kultur (Gewebe) in Flüssigmedien    | 0,031<br>CI95% 0,010 – 0,082 | 0,839<br>CI95% 0,815 – 0,861 | -0,130       |
| Gram-Färbung (Bakterien positiv)    | 0,124<br>CI95% 0,075 – 0,196 | 0,996<br>CI95% 0,989 – 0,999 | 0,120        |
| Gram-Färbung (Granulozyten positiv) | 0,256<br>CI95% 0,185 – 0,342 | 0,896<br>CI95% 0,875 – 0,913 | 0,152        |

\*alle PCR-positiven Proben und PCR-negative Proben mit positivem Erregernachweis in der Kultur auf Festmedien

Im Rahmen der statistischen Auswertung der diagnostischen Verfahren auf der Basis des internen Goldstandards (Tab. 2) erzielte die 16S-rDNA-PCR mit anschließender Sequenzierung von allen Verfahren die höchsten Werte sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität (0,938 bzw. 1,0). Unter den kulturellen Methoden erreichte die Kultur des bioptischen Materials auf Festmedien (ohne Anreicherung) mit 0,301 den höchsten Youden-Index, wohingegen die Anreicherungskultur des bioptischen Materials in Flüssigmedien als einziges der durch die Studie evaluierten Verfahren mit einem negativen Youden-Index von -0,130 assoziiert war. Die Gesamtergebnisse der Kultur des bioptischen Materials waren im Vergleich mit denen der Kultur auf Festmedien ohne Anreicherung mit einer geringfügig besseren Sensitivität verbunden (0,333 vs. 0,302), was allerdings mit Einbußen im Bereich der Spezifität einherging (0,838 vs. 0,999). Die Gram-Färbung des Präparats mit nachfolgender mikroskopischer Beurteilung ergab für den Nachweis von Bakterien und Granulozyten jeweils schwach positive Youden-Indizes (0,120 bzw. 0,152). Der hohen Spezifität beider Tests stand hierbei eine wesentlich niedrigere Sensitivität gegenüber.

## 5 Diskussion

### 5.1 Evaluation der Ergebnisse der konventionellen Diagnostik

Die konventionelle mikrobiologische Diagnostik an im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe entnommenen Biopsien umfasst die Gram-Färbung mit anschließender mikroskopischer Begutachtung des Präparats, das kulturelle Anzuchten von bioptischem Material (ohne Anreicherung und parallel dazu als Anreicherungskultur) und bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer infektiösen Endokarditis die präoperative Abnahme von Blutkulturen. Im Rahmen dieser Studie zeigte sich für die mikroskopische Durchmusterung nach Gram-Färbung eine hohe Spezifität des Nachweises sowohl von Granulozyten als auch Bakterien (siehe Tab. 2). Ein sicherer Ausschluss des Vorliegens einer infektiösen Endokarditis kann aufgrund der geringen Sensitivität des Verfahrens jedoch nicht erfolgen. Insgesamt war die mikroskopische Begutachtung nach Gram-Färbung mit einem relativ niedrigen Youden-Index assoziiert, was den diagnostischen Wert der Methode vom statistischen Standpunkt infrage stellt.

Die Auswertung der Ergebnisse der kulturellen Anzucht des bioptischen Materials zeigt, dass der relative Anteil der Proben mit positivem Erregernachweis an der Gesamtheit aller zur mikrobiologischen Diagnostik eingesandten Proben innerhalb der einzelnen Altersgruppen weitgehend konstant ist (siehe Abb. 2.2). Dieser Befund ist auf die quantitativ dominierende Erregergruppe der typischen Hautkeime zurückzuführen, deren Anteil am Gesamtprobenumfang in allen Altersgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede aufweist. Die Konstanz des Nachweises dieser Erregergruppe legt grundsätzlich den Verdacht auf eine regelmäßig stattfindende Kontamination nahe, der durch den Befund erhärtet wird, dass Hautkeime hochsignifikant häufiger im Rahmen der allgemein deutlich häufiger positiven Anreicherungskultur nachgewiesen wurden, wohingegen im Rahmen der durch geringere absolute Nachweiszahlen charakterisierten Kultur ohne Anreicherung die typischen Erreger der Endokarditis hochsignifikant häufiger zu finden waren. Dennoch kam es auch hier in 15 von 40 Fällen zum Nachweis von Hautkeimen, was die nicht zu unterschätzende Rolle dieser Gruppe von Erregern als potentieller Auslöser einer Endokarditis herausstellt. Bei der statistischen Auswertung der kulturellen Anzucht des bioptischen Materials im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität schnitt die Kultur auf Festmedien am besten ab: Der resultierende Youden-Index war unter allen kulturellen Verfahren mit einem Wert von 0,301 der höchste. Der sehr hohen Spezifität der Methode und der resultierenden hohen diagnostischen Sicherheit positiver Ergebnisse stand dabei wiederum eine relativ niedrige Sensitivität

gegenüber, was die Gefahr von falsch-negativen Befunden bei alleiniger Anwendung dieses Verfahrens aufzeigt. Der negative Youden-Index der Anreicherungskultur mittels Flüssigmedien hingegen muss Zweifel am diagnostischen Benefit der Methode aufkommen lassen und gibt Anlass zur vorsichtigen Interpretation der hiermit erhobenen Befunde. Die Evaluation der Kultur des bioptischen Materials insgesamt ist geprägt von den Vor- und Nachteilen der Kombination der Kultur auf Festmedien und der Anreicherungskultur in Flüssigmedien. Der resultierende Youden-Index liegt nur knapp über dem der mikroskopischen Untersuchung nach Gram-Färbung.

## **5.2 Evaluation der Ergebnisse der 16S-rDNA-PCR vor dem Hintergrund der Ergebnisse der Kultur des bioptischen Materials**

Die Interpretation der Ergebnisse der PCR-Diagnostik im Rahmen dieser Studie muss in Kenntnis der statistischen Daten geschehen, die diese Methode kennzeichnen: Die für die PCR charakteristische Kombination aus sehr hohen Werten sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität des Nachweises bakterieller rDNA – bestätigt durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Marín<sup>24</sup> – resultiert in einem Youden-Index, der deutlich über dem aller anderen evaluierten Verfahren liegt. Dieser Umstand wird auch in der Entwicklung der absoluten Nachweiszahlen deutlich: Die Häufigkeit des Nachweises von Erreger-rDNA durch die PCR mit anschließender Sequenzierung nimmt in Analogie zur Entwicklung der Nachweiszahlen im Rahmen der kulturellen Anzucht bis in die Altersgruppe der 70- bis 79-Jährigen beständig zu, allerdings auf einem deutlich niedrigeren Niveau, was durch die niedrigere Anzahl falsch-positiver Befunde im Vergleich mit den kulturellen Verfahren erklärt werden kann. Die Häufigkeitsverteilung des Nachweises von 16S-rDNA mit dem oben beschriebenen Maximum stimmt dabei mit den aus der Literatur bekannten Daten zur altersabhängigen Zunahme der Inzidenz der infektiösen Endokarditis mit einem Maximum in der Altersgruppe der 70- bis 80-Jährigen überein.<sup>5</sup> Darüber hinaus fällt auf, dass das Erregerspektrum deutliche Unterschiede aufweist: Für die PCR konnte verglichen mit der kulturellen Anzucht des bioptischen Materials insgesamt und der Kultur in Flüssigmedien über alle Altersgruppen hinweg ein hochsignifikant häufigerer Nachweis von typischen Erregern der Endokarditis festgestellt werden; es liegt nahe, dass dieser Befund ebenfalls der überlegenen Spezifität der molekularbiologischen Diagnostik und der damit verbundenen geringeren Anzahl falsch-positiver Befunde geschuldet ist. Im Vergleich mit der kulturellen Anzucht des bioptischen Materials auf Festmedien zeigten sich für die PCR/Sequenzierung

hingegen keine signifikanten Unterschiede, was das Erregerspektrum betrifft, was in Synopsis mit dem relativ hohen Youden-Index der kulturellen Anzucht auf Festmedien für die diagnostische Verlässlichkeit dieser konventionellen Methode spricht und die Entscheidung zur Aufnahme des Verfahrens in den internen Goldstandard zur Berechnung von Sensitivität, Spezifität und Youden-Index der unterschiedlichen diagnostischen Verfahren rechtfertigt. Außerdem konnte der diagnostische Nutzen der PCR/Sequenzierung anhand der Ergebnisse der Synopsis der unterschiedlichen Befundkonstellationen (vgl. Abb. 6.1/6.2) dargestellt werden: In 164 Fällen, was 14,2 % des Gesamtprobenumfangs der Studie entspricht, konnte ein im Nachhinein am ehesten als falsch-positiv zu wertender positiver Erregernachweis im Rahmen der kulturellen Anzucht durch eine negative PCR/Sequenzierung widerlegt werden. Die Auswertung der Zusammensetzung des Erregerspektrums dieser Befundkonstellation, welche in 95,7 % den Nachweis von Hautkeimen erbrachte, deutet ebenfalls auf einen hohen Anteil an potentiellen Kontaminanten hin, zumal sich dieser Anteil hochsignifikant von dem aller PCR-positiven Befundkonstellationen unterscheidet. Die Annahme falsch-positiver Ergebnisse in der Kultur des bioptischen Materials innerhalb dieser Befundkonstellation wird zusätzlich durch den aus Abb. 7 hervorgehenden Befund gestützt, dass der Erregernachweis verglichen mit der Befundkonstellation mit identischen Ergebnissen in der konventionellen und molekularbiologischen Diagnostik signifikant häufiger erst im Rahmen der Anreicherungskultur in Flüssigmedien erbracht wurde; weitere Absicherung erhält die Annahme von Kontaminanten durch den aus Abb. 8.2 hervorgehenden Befund des signifikant häufigeren Nachweises speziell von Hautkeimen im Rahmen von mit einem negativen Youden-Index assoziierten Anreicherungskulturen in Flüssigmedien, wohingegen für die Kategorie der Proben mit identischem Erregernachweis in der kulturellen Anzucht und in der PCR/Sequenzierung keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Nachweisbarkeit beider Erregergruppen mittels Kultur auf Fest- oder in Flüssigmedien festzustellen waren (siehe Abb. 8.1). Abschließend ergibt sich also für die Konstellation der PCR-negativen, kulturell positiven Proben das Bild eines sehr fragwürdigen kulturellen Erregernachweises, der den über die therapeutischen Konsequenzen entscheidenden Kliniker ohne zusätzliche Anwendung nicht-kultureller Methoden mit dem Dilemma der Missachtung eines positiven kulturellen Befundes oder alternativ der eventuellen antibiotischen Behandlung einer möglichen Kontaminante konfrontiert hätte. Der diagnostische Benefit durch die PCR manifestiert sich des Weiteren in der 76 Proben umfassenden PCR-positiven, kulturell negativen Befundkonstellation (siehe Abb. 6.1). Gründe für das Versagen der konventionellen kulturbasierten Diagnostik können unter

anderem antibiotische Vor- oder Anbehandlung, Fehler in der Präanalytik oder auch langsam wachsende oder nicht anzüchtbare Erreger oder solche mit besonderen Anforderungen an das Kulturmedium sein. Dennoch ist auch unter solchen für die kulturelle Anzucht ungünstigen Bedingungen der Erregernachweis mittels PCR/Sequenzierung möglich, was auf die wichtige Rolle hindeutet, die dieses Verfahren in der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik einnimmt. Dabei muss betont werden, dass insbesondere die Gruppe der seltenen typischen Erreger der Endokarditis (bestehend z.B. aus der HACEK-Gruppe, *Coxiella burnetii* und *Tropheryma whippelii*) ausschließlich mittels PCR nachgewiesen werden konnten, was auch in der Literatur beispielsweise durch eine Publikation von Geißdörfer et al.<sup>25</sup> belegt wird, in welcher der molekularbiologische Nachweis von insgesamt 16 Fällen kulturnegativer, durch *Tropheryma whippelii* verursachter Endokarditis geführt wurde.

Die Gruppe der PCR-positiven, kulturell diskrepanten Proben zeigt eine weitere diagnostische Situation auf, die vom Einsatz der PCR profitiert: Aufgrund der höheren Spezifität der PCR muss hier die Möglichkeit einer Kontamination mit falschem Erregernachweis durch die kulturelle Anzucht in Betracht gezogen werden. Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, dass im Rahmen der PCR in neun von zehn Fällen typische Erreger der Endokarditis nachgewiesen werden konnten. Sehr ähnliche diagnostische Situationen wurden bereits durch Petti et al.<sup>26</sup> beschrieben. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass hier der hohe relative Anteil typischer Erreger einer niedrigen absoluten Anzahl an Proben gegenübersteht. Schließlich konnte auch bei 35 Proben mit identischem Erregernachweis durch Kultur des biotischen Materials und PCR eine diagnostische Bereicherung durch die molekularbiologische Methode festgestellt werden: Insbesondere beim kulturellen Nachweis von Hautkeimen war die zusätzliche Bestätigung mittels PCR von großer Relevanz, um mit größerer Sicherheit zwischen potentieller Kontaminante und tatsächlicher Infektion unterscheiden zu können. Zusätzliche Glaubwürdigkeit erhalten diese Befunde durch die Tatsache, dass es beim Vorliegen dieser Befundkonstellation keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit des Nachweises von typischen Erregern der Endokarditis bzw. von Hautkeimen im Rahmen der Kultur des biotischen Materials auf Festmedien bzw. in Flüssigmedien gab.

### 5.3 Evaluation der kombinierten Anwendung kultureller und molekularbiologischer Verfahren

Um eine konkrete Aussage über den tatsächlichen diagnostischen Nutzen einzelner Verfahren zu treffen, wurde erneut die gegenüberstellende Darstellung der Befunde gewählt. Wie aus Abb. 10.1 hervorgeht, bestand in der zusätzlichen Durchführung der PCR/Sequenzierung in 40 % der PCR-positiven Fälle ein unmittelbarer diagnostischer Benefit, da hiermit das Problem der Diskrepanz der Ergebnisse der Kultur des bioptischen Materials und der Blutkultur gelöst werden konnte.

In weiteren 8 % der Fälle lieferte die PCR ein zusätzliches diskrepantes Ergebnis, das allerdings aufgrund der sehr hohen Spezifität des Verfahrens mit höherer Wahrscheinlichkeit auf den ursächlichen Erreger hinweist als die Resultate der konventionellen kulturellen Methoden, die statistisch häufiger falsch-positive Keimnachweise liefern. Ebenfalls unverzichtbar waren die molekularbiologischen Verfahren in weiteren 36 % der Fälle, in denen dem positiven Keimnachweis mittels PCR ein komplettes Versagen der kulturellen Diagnostik gegenüberstand. Diese Befundkonstellation liegt häufig vor bei bereits eingeleiteter Antibiose, langsam wachsenden Erregern und solchen mit speziellen Ansprüchen an das Kulturmedium oder nach Fehlern in der Präanalytik, die die kulturelle Anzucht erschweren oder gar unmöglich machen. Eine solche diagnostische Situation und die daraus erwachsende Notwendigkeit für die Anwendung kulturunabhängiger Verfahren ist auch vielfach in der Literatur beschrieben.<sup>27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39</sup> Schließlich konnte die PCR/Sequenzierung in 16 % der Fälle Übereinstimmungen der kulturellen Diagnostik erneut bestätigen, was speziell im Falle des Nachweises von allgemein als apathogen eingestuftem Erregern oder solchen, die nur sehr selten als Auslöser einer infektiösen Endokarditis beschrieben sind, eine wichtige Unterstützung der Ergebnisse der konventionellen Diagnostik darstellt, was vielfach in der Literatur durch Fallberichte z.B. von Wallet et al.,<sup>40</sup> Dzeing-Ella et al.<sup>41</sup> und Navas et al.<sup>42</sup> bestätigt wird. Des Weiteren ist die schnelle und sichere Verifizierung kultureller Ergebnisse auf Subspeziesebene eine sinnvolle Ergänzung der konventionellen Diagnostik<sup>43,44</sup> mit entsprechenden Konsequenzen, was die Therapie des Patienten anbelangt.<sup>24,39</sup>

In der Gruppe der PCR-negativen Proben ließ sich in insgesamt 38 % der Fälle eine Diskrepanz zwischen den kulturellen Verfahren erneut mittels PCR auflösen: Aufgrund der wesentlich höheren Sensitivität der PCR muss bei der Interpretation des jeweils positiven Erregernachweises im Rahmen der Blutkultur bzw. der Kultur des bioptischen Materials in diesen Fällen die Möglichkeit der Kontamination unbedingt in Betracht gezogen werden. In

weiteren 58 % der Fälle mit negativem PCR-Befund konnte dieser einen übereinstimmend negative Befund der Kultur des bioptischen Materials und der Blutkultur bestätigen. Ohne zusätzlichen Einsatz der PCR/Sequenzierung hätte man in diesen Fällen jedoch nicht mit Sicherheit ausschließen können, dass eventuell langsam wachsende Erreger oder solche mit speziellen Ansprüchen an das Kulturmedium am Entstehungsprozess des Klappenitiums beteiligt sind. Des Weiteren hätten auch in diesen Fällen eine denkbare antibiotische Vorbehandlung und Fehler in der Präanalytik kulturell falsch-negative Befunde bedingen können; allerdings konnten auch diese Umstände durch das negative PCR-Ergebnis weitgehend ausgeschlossen werden. Abschließend zu erwähnen sind noch 4 % der PCR-negativen Proben mit identischem Keimnachweis im Rahmen der Blutkultur und in der kulturellen Anzucht des bioptischen Materials, was die Vermutung nahelegt, dass hier die PCR versagt haben könnte. Grundsätzlich untauglich war die PCR in einem Fall mit kulturellem Nachweis von *Candida tropicalis*, da bei Pilzinfektionen der Ansatz der PCR an bakterieller 16S-rDNA prinzipiell scheitern muss. Zur weiteren Ausdehnung der Sensitivität des Verfahrens auch auf den Bereich der Pilzinfektionen ist deshalb der parallele Einsatz einer 18S-rDNA-PCR sinnvoll.

#### **5.4 Zusammenfassung der Vor- und Nachteile molekularbiologischer Verfahren und Ausblick**

Molekularbiologische Methoden sind in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des Interesses der klinischen Mikrobiologie gerückt, was durch die steigenden Veröffentlichungszahlen beispielsweise zum Thema „16S rDNA“ veranschaulicht wird (siehe Abb. 1). Eine zentrale Bedeutung kommt den kulturunabhängigen Nachweisverfahren zum einen bei der Entdeckung bislang unbekannter Erreger zu, da nur mithilfe der DNA-Sequenzierung genetische Informationen bis auf die Ebene einzelner Basenpaare ermittelt werden können, die dann wiederum mithilfe entsprechender Datenbanken zum Vergleich mit bereits bekannten Spezies genutzt werden können. Die Liste entsprechender Veröffentlichungen<sup>30,45,46,47,48,49,50,51</sup> hat dabei im Laufe der letzten Jahre mit zunehmender Verbreitung der Verfahren beständig an Länge zugenommen und zur Verbesserung der Kenntnis des Erregerspektrums der infektiösen Endokarditis beigetragen.<sup>52</sup> Eine weitere wichtige Rolle spielt die PCR mit anschließender Sequenzierung bei der Differenzierung von Mikroorganismen auf (Sub-)Speziesebene: Entsprechende Fallberichte mit der Beschreibung einer primär insuffizienten Differenzierung mittels konventionell-



phänotypischer Methoden sind vielfach in der Literatur zu finden<sup>28,29,30,53,54,55,56,57,58,59</sup> und führen als Grund beispielsweise die mangelnde Erfassbarkeit von mitunter erst kürzlich entdeckten Erregern mit aktuell handelsüblichen Tests auf Grundlage der biochemischen Eigenschaften der Erreger an.<sup>53,60</sup> In diesem Kontext muss auch die Bedeutung einer maximal exakten Differenzierung für die Entscheidung des klinisch tätigen Arztes über das zu wählende Antibiotikum herausgestellt werden. Ein weiterer Vorteil gegenüber der konventionellen Diagnostik liegt in der zeitnahen Verfügbarkeit der Befunde, was vor allem beim Vorliegen von Infektionen mit langsam wachsenden Erregern (wie in den Veröffentlichungen von Jönsson et al.,<sup>61</sup> Gatselis et al.<sup>62</sup> und Brouqui et al.<sup>63</sup> beschrieben) von größter Wichtigkeit sein kann.

Dennoch ist die molekularbiologische Diagnostik derzeit noch mit einer Reihe von Insuffizienzen behaftet. Als Beispiel sei hier der aktuell fehlende Konsens hinsichtlich verbindlicher cut-off-Werte genannt, was den maximal zulässigen Prozentsatz an abweichenden Basenpaaren innerhalb einer Erregerspezies anbelangt.<sup>64,65</sup> Die Komplexität dieser Problematik wird zudem durch die Tatsache erschwert, dass unterschiedliche Spezies mitunter durch 16S-rDNA-PCR und anschließende Sequenzierung nicht zu unterscheiden sind, wie es beispielsweise bei *Burkholderia pseudomallei* und *Burkholderia thailandensis*<sup>64</sup> oder Vertretern der *Streptococcus mitis*-Gruppe<sup>66</sup> der Fall ist. In solchen Fällen kann die Bestimmung der Sequenz weiterer erregerspezifischer Gen-Targets wie groEL erforderlich werden und zur sicheren Erregerbestimmung beitragen. Auch die Zusammenschau der molekularbiologischen Ergebnisse und der konventionellen biochemischen Eigenschaften des Erregers kann bei fraglicher Trennschärfe der Sequenzierungsbefunde die Interpretation erleichtern.

Ein weiterer verbesserungsfähiger Faktor im Zusammenhang mit kulturunabhängiger Diagnostik besteht in den Software-Paketen und Datenbanken, welche die Referenzsequenzen zum Vergleich mit den im Labor bestimmten Sequenzen aus klinischem Material bereitstellen. Die darin enthaltenen Daten sind vor allem bei Nutzung von öffentlichen Datenbanken wie GenBank in einer nicht unerheblichen Anzahl von Fällen unzureichend validiert<sup>64,65,66,67</sup> und können außerdem nur bei regelmäßiger Aktualisierung erst kürzlich beschriebene, aber möglicherweise klinisch relevante Spezies nachweisen. Allerdings ist zu erwarten, dass die auch in Zukunft stattfindende ständige Pflege und Weiterentwicklung der Software-Angebote und Datenbanken die aktuell bestehenden diagnostischen Lücken zunehmend füllen werden.

Zusätzlich zur Optimierung bereits etablierter Anwendungen finden sich außerdem Beispiele für vielversprechende Verfahren, die künftig Einzug in die klinische Routinediagnostik halten könnten, wie die z.B. durch Dreier et al.<sup>68</sup> beschriebene PCR-basierte Amplifizierung von erregerspezifischer mRNA zum Nachweis lebender Erreger. Hiermit würde eine der grundsätzlichen Einschränkungen kulturunabhängiger Methoden wegfallen, nämlich die Unmöglichkeit der Differenzierung zwischen lebenden und toten Erregern, was u.a. in einer Arbeit von Branger et al.<sup>69</sup> anhand der Persistenz von Erreger-rDNA in Herzklappen sieben Jahre nach abgeheilter Endokarditis demonstriert wurde. Auch die PCR-Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (PCR/ESI-MS), welche 2013 durch Brinkman et al.<sup>70</sup> erfolgreich in der Endokarditis-Diagnostik eingesetzt wurde, bietet aufgrund der Möglichkeit des gleichzeitigen Nachweises mehrerer Erreger mit damit einhergehender gesteigerter Sensitivität gegenüber gängigen molekularbiologischen Verfahren diagnostische Vorteile; allerdings bleibt dieses Spezialverfahren aufgrund der bislang geringen Verbreitung personell und technisch entsprechend ausgestatteten Zentren vorbehalten.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass kulturunabhängige Verfahren zum Nachweis bakterieller Infektionserkrankungen wie der Endokarditis eine wichtige Säule in der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik darstellen und somit die Aufnahme der 16S-rDNA-PCR mit anschließender Sequenzierung in die Duke-Kriterien – wie bereits durch Millar et al.<sup>71</sup> vorgeschlagen – angedacht werden sollte. Angesichts des vielversprechenden Entwicklungs- und Optimierungspotentials, welches diese Verfahren in sich tragen, sind außerdem auch in Zukunft neue Impulse und Innovationen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Diagnostik zu erwarten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Buselmaier W (ed) (2007) *Biologie für Mediziner*. 10. Auflage. Springer, Heidelberg
2. Contrepois A (1996) Towards a history of infective endocarditis. *Med Hist* 40:25-54
3. Millar BC, Moore JE (2004) Emerging issues in infective endocarditis. *Emerg Infect Dis* 10:1110-1116
4. Moreillon P, Que YA (2004) Infective endocarditis. *Lancet* 363:139-149
5. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, de Jesus Antunes M, Thilen U, Lekakis J, Lengyel M, Müller L, Naber CK, Nihoyannopoulos P, Moritz A, Zamorano JL; ESC Committee for Practice Guidelines (2009) Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J* 30:2369-2413
6. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ (2002) Healthcare-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 137:791-797
7. Letaief A, Boughzala E, Kaabia N, Ernez S, Abid F, Chaabane TB, Jemaa MB, Boujnah R, Chakroun M, Daoud M, Gaha R, Kafsi N, Khalfallah A, Slimane L, Zaouali M (2007) Epidemiology of infective endocarditis in Tunisia: a 10-year multicenter retrospective study. *Int J Infect Dis* 11:230-233
8. Croft LB, Donnino R, Shapiro R, Indes J, Fayngersh A, Squire A, Goldman ME (2004) Age-related prevalence of cardiac valvular abnormalities warranting infectious endocarditis prophylaxis. *Am J Cardiol* 94:386-389
9. Que YA, Haefliger JA, Piroth L, Francois P, Widmer E, Entenza JM, Sinha B, Herrmann M, Francioli P, Vaudaux P, Moreillon P (2005) Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med* 201:1627-1635

10. Moreillon P, Que YA, Bayer AS (2002) Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 16:297-318
11. Moreillon P, Overholser CD, Malinverni R, Bille J, Glauser MP (1988) Predictors of endocarditis in isolates from cultures of blood following dental extractions in rats with periodontal disease. *J Infect Dis* 157:990-995
12. van der Meer JT, Thompson J, Valkenburg HA, Michel MF (1992) Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands. I. Patient characteristics. *Arch Intern Med* 152:1863-1868
13. Strom BL, Abrutyn E, Berlin JA, Kinman JL, Feldman RS, Stolley PD, Levison ME, Korzeniowski OM, Kaye D (1998) Dental and cardiac risk factors for infective endocarditis. A population-based, case-control study. *Ann Intern Med* 129:761-769
14. Prendergast BD (2006) The changing face of infective endocarditis. *Heart* 92:879-885
15. Perez de Isla L, Zamorano J, Lennie V, Vazquez J, Ribera JM, Macaya C (2007) Negative bloodculture infective endocarditis in the elderly: long-term follow-up. *Gerontology* 53:245-249
16. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG Jr, Ryan T, Bashore T, Corey GR (2000) Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 30:633-638
17. Thuny F, Di Salvo G, Belliard O, Avierinos JF, Pergola V, Rosenberg V, Casalta JP, Gouvernet J, Derumeaux G, Iarussi D, Ambrosi P, Calabro R, Riberi A, Collart F, Metras D, Lepidi H, Raoult D, Harle JR, Weiller PJ, Cohen A, Habib G (2005) Risk of embolism and death in infective endocarditis: prognostic value of echocardiography: a prospective multicenter study. *Circulation* 112:69-75
18. Sachdev M, Peterson GE, Jollis JG (2002) Imaging techniques for diagnosis of infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 16:319-337
19. Evangelista A, Gonzalez-Alujas MT (2004) Echocardiography in infective endocarditis. *Heart* 90:614-617
20. Lamas CC, Eykyn SJ (2003) Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. *Heart* 89:258-262

21. Tornos P, Iung B, Permanyer-Miralda G, Baron G, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Butchart EG, Ravaud P, Vahanian A (2005) Infective endocarditis in Europe: lessons from the Euro heart survey. *Heart* 91:571-575
22. Lockhart PB (2000) The risk for endocarditis in dental practice. *Periodontol* 23:127-135
23. Duval X, Leport C (2008) Prophylaxis of infective endocarditis: current tendencies, continuing controversies. *Lancet Infect Dis* 8:225–232
24. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E (2007) Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine (Baltimore)* 86:195-202
25. Geissdörfer W, Moos V, Moter A, Loddenkemper C, Jansen A, Tandler R, Morguet AJ, Fenollar F, Raoult D, Bogdan C, Schneider T (2012) High frequency of *Tropheryma whippelii* in culture-negative endocarditis. *J Clin Microbiol* 50:216-222
26. Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P (2005) The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* 43:6123-6125
27. Gauduchon V, Benito Y, Célard M, Mouren C, Delorme V, Philippe-Bert J, Etienne J, Vandenesch F (2001) Molecular diagnosis of recurrent *Streptococcus mutans* endocarditis by PCR amplification and sequencing. *Clin Microbiol Infect* 7:36-37
28. Elsayed S, Zhang K (2004) *Gemella bergeriae* endocarditis diagnosed by sequencing of rRNA genes in heart valve tissue. *J Clin Microbiol* 42:4897-4900
29. Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, Célard M, Benito Y, Lepidi H, Thivolet-Béjui F, Vandenesch F (2003) Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 41:763-766
30. Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 17:840-862

31. Bothelo E, Gouriet F, Fournier PE, Roux V, Habib G, Thuny F, Metras D, Raoult D, Casalta JP (2006) Endocarditis caused by *Cardiobacterium valvarum*. *J Clin Microbiol* 44:657-658
32. Masliah-Planchon J, Breton G, Jarlier V, Simon A, Benveniste O, Herson S, Drieux L (2009) Endocarditis due to *Neisseria bacilliformis* in a patient with a bicuspid aortic valve. *J Clin Microbiol* 47:1973-1975
33. Cotar AI, Badescu D, Oprea M, Dinu S, Banu O, Dobreanu D, Dobreanu M, Ionac A, Flonta M, Straut M (2011) Q Fever Endocarditis in Romania: The First Cases Confirmed by Direct Sequencing. *Int J Mol Sci* 12:9504-9513
34. Wilck MB, Wu Y, Howe JG, Crouch JY, Edberg SC (2001) Endocarditis caused by culture-negative organisms visible by Brown and Brenn staining: utility of PCR and DNA sequencing for diagnosis. *J Clin Microbiol* 39:2025-2027
35. Schweiger M, Stiegler P, Scarpatetti M, Wasler A, Sereinigg M, Prenner G, Tscheliessnigg K (2011) Case of *Paracoccus yeei* infection documented in a transplanted heart. *Transpl Infect Dis* 13:200-203
36. Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D (2000) *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an Agent of Afebrile Blood Culture-Negative Endocarditis in a Human. *J Clin Microbiol* 38:1698
37. Rodrick D, Dillon B, Dexter M, Nicholson I, Marcel S, Dickeson D, Iredell J (2004) Culture-negative endocarditis due to Houston Complex *Bartonella henselae* acquired in Noumea, New Caledonia. *J Clin Microbiol* 42:1846-1848
38. Casalta JP, Habib G, La Scola B, Drancourt M, Caus T, Raoult D (2002) Molecular diagnosis of *Granulicatella elegans* on the cardiac valve of a patient with culture-negative endocarditis. *J Clin Microbiol* 40:1845-1847
39. Vollmer T, Piper C, Horstkotte D, Körfer R, Kleesiek K, Dreier J (2010) 23S rDNA real-time polymerase chain reaction of heart valves: a decisive tool in the diagnosis of infective endocarditis. *Eur Heart J* 31:1105-1113

40. Wallet F, Dessein R, Armand S, Courcol RJ (2002) Molecular diagnosis of endocarditis due to *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Clin Infect Dis* 35:117-119
41. Dzeing-Ella A, Szwebel TA, Loubinoux J, Coignard S, Bouvet A, Le Jeune C, Aslangul E (2009) Infective endocarditis due to *Citrobacter koseri* in an immunocompetent adult. *J Clin Microbiol* 47:4185-4186
42. Navas ME, Hall G, El Bejjani D (2013) A case of endocarditis caused by *Lactococcus garvieae* and suggested methods for identification. *J Clin Microbiol* 51:1990-1992
43. Kim SY, Joo SI, Yi J, Kim EC (2010) A case of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* infective endocarditis with colon cancer: identification by 16S ribosomal DNA sequencing. *Korean J Lab Med* 30:160-165
44. Herrero IA, Rouse MS, Piper KE, Alyaseen SA, Steckelberg JM, Patel R (2002) Reevaluation of *Streptococcus bovis* endocarditis cases from 1975 to 1985 by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 40:3848-3850. Erratum in: *J Clin Microbiol* 41:916
45. Roggenkamp A, Abele-Horn M, Trebesius KH, Tretter U, Autenrieth IB, Heesemann J (1998) *Abiotrophia elegans* sp. nov., a possible pathogen in patients with culture-negative endocarditis. *J Clin Microbiol* 36:100-104
46. Jobbagy Z, Fabian CB, Memoli VA, Schwartzman JD (2004) A novel *Streptococcus* organism identified in a case of fulminant endocarditis using 16S rDNA sequencing. *J Mol Diagn* 6:145-148
47. Riegel P, Creti R, Mattei R, Nieri A, von Hunolstein C (2006) Isolation of *Corynebacterium tuscaniae* sp. nov. from blood cultures of a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol* 44:307-312
48. Lin EY, Tsigrelis C, Baddour LM, Lepidi H, Rolain JM, Patel R, Raoult D (2010) *Candidatus Bartonella mayotimonensis* and endocarditis. *Emerg Infect Dis* 16:500-503
49. Buscher A, Li L, Han XY, Trautner BW (2010) Aortic valve endocarditis possibly caused by a *Haematobacter*-like species. *J Clin Microbiol* 48:3791-3793

50. Pearce MM, Theodoropoulos N, Noskin GA, Flaherty JP, Stemper ME, Aspeslet T, Cianciotto NP, Reed KD (2011) Native valve endocarditis due to a novel strain of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 49:3340-3342
51. Park SY, Kang SJ, Joo EJ, Ha YE, Baek JY, Wi YM, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song JH (2012) Prosthetic valve endocarditis due to *Neisseria skkuensis*, a novel *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* 50:2820-2822
52. Breikopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K (2005) Impact of a Molecular Approach to Improve the Microbiological Diagnosis of Infective Heart Valve Endocarditis. *Circulation* 111:1415-1421
53. Le Brun C, Bouet J, Gautier P, Avril JL, Gaillot O (2005) *Kytococcus schroeteri* endocarditis. *Emerg Infect Dis* 11:179-180
54. Fradiani PA, Petrucca A, Ascenzioni F, Di Nucci G, Teggi A, Bilancini S, Cipriani P (2010) Endocarditis caused by *Lactobacillus jensenii* in an immunocompetent patient. *J Med Microbiol* 59:607-609
55. Faibis F, Mihaila L, Perna S, Lefort JF, Demachy MC, Le Flèche-Matéos A, Bouvet A (2008) *Streptococcus sinensis*: an emerging agent of infective endocarditis. *J Med Microbiol* 57:528-531
56. Zé-Zé L, Tenreiro R, Duarte A, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Lito L, Carmo MM, Felisberto S, Carmo G (2004) Case of aortic endocarditis caused by *Lactobacillus casei*. *J Med Microbiol* 53:451-453
57. Tran MP, Caldwell-McMillan M, Khalife W, Young VB (2008) *Streptococcus intermedius* causing infective endocarditis and abscesses: a report of three cases and review of the literature. *BMC Infect Dis* 10:154
58. Evans M, Yazdani F, Malnick H, Shah JJ, Turner DP (2007) Prosthetic valve endocarditis due to *Neisseria elongata* subsp. *elongata* in a patient with Klinefelter's syndrome. *J Med Microbiol* 56:860-862
59. Yoda M, Hata M, Sezai A, Unosawa S, Furukawa N, Minami K (2008) First report of *Bartonella quintana* endocarditis in Japan. *Circ J* 72:1022-1024



60. Mnif B, Boujelbène I, Mahjoubi F, Gdoura R, Trabelsi I, Moalla S, Frikha I, Kammoun S, Hammami A (2006) Endocarditis due to *Kytococcus schroeteri*: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol* 44:1187-1189
61. Jönsson G, Rydberg J, Sturegård E, Christensson B (2012) A case of *Mycobacterium goodii* prosthetic valve endocarditis in a non-immunocompromised patient: use of 16S rDNA analysis for rapid diagnosis. *BMC Infect Dis* 12:301
62. Gatselis N, Malli E, Papadamou G, Petinaki E, Dalekos GN (2006) Direct detection of *Cardiobacterium hominis* in serum from a patient with infective endocarditis by broad-range bacterial PCR. *J Clin Microbiol* 44:669-672
63. Brouqui P, Raoult D (2001) Endocarditis Due to Rare and Fastidious Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 14:177-207
64. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY (2008) Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 14:908-934
65. Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol* 45:2761-2764
66. Petti CA (2007) Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis* 44:1108-1114
67. Boudewijns M, Bakkers JM, Sturm PD, Melchers WJ (2006) 16S rRNA gene sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: a perfect marriage? *J Clin Microbiol* 44:3469-3470
68. Dreier J, Szabados F, von Herbay A, Kröger T, Kleesiek K (2004) *Tropheryma whippelii* Infection of an acellular porcine heart valve bioprosthesis in a patient who did not have intestinal Whipple's disease. *J Clin Microbiol* 42:4487-4493
69. Branger S, Casalta JP, Habib G, Collard F, Raoult D (2003) *Streptococcus pneumoniae* endocarditis: persistence of DNA on heart valve material 7 years after infectious episode. *J Clin Microbiol* 41:4435-4437
70. Brinkman CL, Vergidis P, Uhl JR, Pritt BS, Cockerill FR, Steckelberg JM, Baddour LM, Maleszewski JJ, Edwards WD, Sampath R, Patel R (2013) PCR-Electrospray Ionization Mass

Spectrometry for Direct Detection of Pathogens and Antimicrobial Resistance from Heart Valves in Patients with Infective Endocarditis. *J Clin Microbiol* 51:2040-2046

71. Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, Raoult D, Earle J, Hone R, Murphy P (2001) Molecular diagnosis of infective endocarditis - a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis* 33:673-680

## 7 Publikationen/Danksagung

### 7.1 Mitautorenschaften

Wissenschaftliche Vorträge und Poster ohne zitierfähiges Abstract:

- 5/2011 Von Müller L, Wick O, Schäfers H-J, Herrmann M:  
Detection of bacterial endocarditis by using culture and culture-independent analysis of cardiac biopsies.  
21<sup>st</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – 27<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy (Poster)  
Mailand, Italien, 7. – 10. Mai 2011
- 9/2011 Von Müller L, Wick O, Schäfers H-J, Herrmann M:  
Culture-dependent and independent analysis of cardiac valve biopsies.  
63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (Vortrag)  
Essen, 25. – 28. September 2011

Publikationen:

- 11/2013 Von Müller L, Löhfelme B, Daneshvar-Talebi J, Hoffmann P, Millenaar D, Wick O, Walter P, Haag M, Igel C, Herrmann M (2013):  
Anforderungen von Studierenden an e-Learning-Systeme und an die Gestaltung elektronischer Fallbeispiele/Student's specifications of e-learning systems for case-based teaching.  
GMS Med Inform Biom Epidemiol 9:Doc18
- 10/2014 Wick O, Fleckenstein J (2014):  
Stellenwert der palliativen Radiotherapie im Stadium III und IV des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms.  
Atemweg Lungenkrank 40:442-445

## 7.2 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Lutz Freiherr von Müller, der mir über Jahre hinweg immer geduldig und mit erfahrener Rat zur Seite stand und mich mit inspirierenden Gedanken und Anregungen dazu motivierte, stets noch ein bisschen mehr aus dem umfangreichen Thema herauszuholen, das er mir anvertraut hat.

Ebenfalls von Herzen danken möchte ich meiner Mutter für die Entlastung und Unterstützung aller Art, die ich während dieser Zeit durch sie erfahren habe. Großen Dank möchte ich auch Herrn Oberarzt Dr. med. Jochen Fleckenstein (Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie) für die kritische Durchsicht der Arbeit und die Optimierungsvorschläge aussprechen.

Außerdem möchte ich mich noch bei den Mitarbeiterinnen des PCR-Labors des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene für die stets freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken.

Manche Projekte können nur in Zusammenarbeit mit einem großartigen Team gelingen und ich bin mir sicher, dass es sich bei dieser Arbeit um ein solches handelt. Also noch einmal ein großes Dankeschön an alle Beteiligten!

## 8 Lebenslauf

### Oliver Robert Wick

|                     |  |
|---------------------|--|
| Adresse             | Mühlbergstraße 23<br>66482 Zweibrücken |
| Telefon             | 06332-471838                           |
| e-mail              | OliverWick@googlemail.com              |
| Geburtsdatum        | 23. März 1988                          |
| Geburtsort          | Bad Dürkheim                           |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                                |
| Familienstand       | ledig                                  |

### Schulbildung

1994 – 1998 Thomas-Mann-Grundschule Zweibrücken  
1998 – 2007 Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken; Abitur (Note 1,0)

### Studium

WS 2007/2008 – SS 2009 Vorklinisches Studium an der Universität des Saarlandes/Homburg  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Herbst 2009

WS 2009/2010 – SS 2012 Klinisches Studium an der Universität des Saarlandes/Homburg

2/2011 – 3/2011 Famulatur in der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes

8/2011 – 9/2011 Famulatur in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes

|                  |   |
|------------------|---|
| 9/2011 – 10/2011 | Famulatur in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes                                 |
| 3/2012 – 4/2012  | Famulatur in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums des Saarlandes |
| 8/2012 – 12/2012 | Chirurgisches PJ-Tertial am Universitätsklinikum des Saarlandes   |
| 12/2012 – 4/2012 | Internistisches PJ-Tertial am Universitätsklinikum des Saarlandes   |
| 4/2012 – 6/2012  | Wahl-PJ-Tertial in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes  |
| 11/2013          | Abschluss des Medizinstudiums mit dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 2,16)                |

### **Tätigkeit als studentische wissenschaftliche Hilfskraft**

|                 |  |
|-----------------|--|
| 6/2010 – 3/2011 | Mitarbeit am e-learning-Projekt des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene |
| 4/2012 – 9/2012 | dito   |

### **Beruflicher Werdegang**

|              |  |
|--------------|--|
| seit 12/2013 | Assistenzarzt an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes |
|--------------|--|

Zweibrücken, den 19. April 2015