

Diplomarbeit

**Methodenvergleich von 16S rRNA Sequenzierung und
konventionellen Kulturmethoden bei infektiöser Endokarditis**

eingereicht von

Mrkalj Danijela

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Universitätsklinikum für Innere Medizin

Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin

unter der Anleitung von

Ass.Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Ines Zollner-Schwetz

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 15.04.2016

Mrkalj Danijela eh

Danksagung

Recht herzlich möchte ich mich bei Ass.Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Ines Zollner-Schwetz für die Unterstützung und das Interesse während der Erstellung dieser Diplomarbeit bedanken. Vor allem dafür, dass sie sich neben dem Berufsalltag im Klinikum immer Zeit genommen hat und ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, besonders meiner Mama. Sie haben es mir überhaupt ermöglicht das Studium der Medizin zu beginnen und haben mich während der Jahre geistig wie auch finanziell unterstützt und mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Ebenfalls ein großes und besonderes Danke an meine Freundin und Mitbewohnerin Lisa für alles was wir miteinander durchgemacht haben. Ein großes Danke auch allen anderen Freunden mit denen die Studienzeit eine wundervolle und unvergessliche war, an welche ich mich immer gerne und mit einem Lächeln erinnern werde. Von Herzen möchte ich mich bei meiner Großcousine Sanja für die Unterstützung und Rat während der Erstellung dieser Diplomarbeit bedanken!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	4
Abstract	5
1.1 Infektiöse Endokarditis.....	6
1.1.1 Allgemeines.....	6
1.1.2 Pathophysiologie und Pathogenese	7
1.1.3 Epidemiologie	10
1.1.4 Klinik / Symptomatik	13
1.1.5 Ätiologie.....	16
1.1.6 Diagnostik	19
1.1.7 Therapie.....	26
1.1.8 Prophylaxe/Prävention	36
1.2 Molekularbiologische Techniken in der Diagnostik der IE.....	38
1.2.1. Einleitung	38
1.2.2. 16SribosomaleRibonukleinsäure(rRNA)- Sequenzierung	40
1.2.3. Next-Generation Sequencing	42
2 Methoden	46
3 Ergebnisse	48
4 Diskussion.....	57
5 Literaturverzeichnis	67

Abkürzungen

IE:	Infektiöse Endokarditis
ICD:	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
NBTE:	Nicht bakterielle thrombotische Endokarditis
KNS:	Koagulase- negative Staphylokokken
CRP:	C- reaktives Protein
MRT:	Magnetresonanztomographie
CT:	Computertomographie
PET:	Positronenemissionstomographie
MSCT:	Multislice-Computertomographie
MRSA:	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
TTE:	Transthorakale Echokardiographie
TEE:	Transösophageale Echokardiographie
PCR:	Polymerasekettenreaktion
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
RNA:	Ribonukleinsäure
NGS:	Next Generation Sequencing
MPS:	Massively Parallel Sequencing
PGM:	Personal Genome Machine
SBS:	Sequencing-by-Synthesis
HACEK:	<i>Haemophilus</i> Spezies, <i>Aggregatibacter</i> Spezies, <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Eikenella</i> Spezies, und <i>Kingella</i> Spezies

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Splinter-Blutung.....	15
Abbildung 2: Lungenherde bei Rechtsherzendokarditis	25
Abbildung 3: Grundprinzip der NGS (aus (170)).....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der infektiösen Endokarditis laut den ESC-Guidelines (aus (11)).....	13
Tabelle 2: Modifizierte Duke-Kriterien (aus(78)).....	20
Tabelle 3:Empirische Therapie der IE nach den ESC Guidelines 2015 (aus (54))	28
Tabelle 4: Empirische Therapie der IE laut den Guidelines der Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (aus (94)).....	29
Tabelle 5: Indikationen für einen operativen Eingriff mit Dringlichkeitsstufe (aus (54))	35
Tabelle 6: Antibiotikaprophylaxe der ESCGuidelines für IE (aus (54)).....	38
Tabelle 7: Ergebnisse der unterschiedlichen Diagnostikmethoden.....	50

Zusammenfassung

Hintergrund: Die infektiöse Endokarditis (IE) ist eine seltene, aber potentiell lebensbedrohliche Erkrankung und weist trotz des beachtlichen Fortschrittes hinsichtlich der Diagnostik und Therapie in den letzten Jahrzehnten eine 1-Jahres-Mortalität von etwa 30% auf. Um den PatientInnen eine adäquate und gezielte Therapie zu gewährleisten, ist der Nachweis der verursachenden Erreger von größter Bedeutung. Konventionelle mikrobiologische Diagnostikmethoden wie Blutkulturen bleiben jedoch in bis zu 31% der IE-Fälle negativ. Ziel dieser Diplomarbeit war es die 16S rRNA Sequenzierung als kulturunabhängige Methode mit konventionellen Diagnostikmethoden der IE bezüglich des Erregernachweises zu vergleichen.

Methoden: Es wurde eine retrospektive Datenanalyse von 21 PatientInnen durchgeführt. Alle PatientInnen wurden im Zeitraum von April 2009 bis November 2014 auf der Klinischen Abteilung für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Graz einer Herzklappenoperation unterzogen. Das entnommene Herzklappengewebe wurde für den Erregernachweis mittels 16S rRNA Sequenzierung verwendet. Die Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzierung wurden mit den Ergebnissen der konventionellen Diagnostikmethoden (Blutkultur, Klappenkultur, Serologie, Histologie) der IE verglichen.

Ergebnisse: In 13 von 21 Fällen (61,9%) stimmte die 16S rRNA Sequenzierung in der Erregeridentifizierung mit den anderen Diagnostikmethoden überein. In 9 von diesen 13 Fällen konnte die Diagnose einer IE gesichert und ein Erreger identifiziert werden. 4 der 13 übereinstimmenden Fälle erwiesen sich als Negativkontrolle und die Diagnose der IE wurde verworfen. In einem von 21 Fällen (4,8%) konnte der Erreger ausschließlich mit 16S rRNA identifiziert werden. 6 der 21 Fälle (28,6%) wurden im Rahmen der retrospektiven Datenanalyse aus unterschiedlichen Gründen als unklar eingestuft. In einem von 21 Fällen (4,8%) versagte die 16S rRNA in der Erregeridentifizierung.

Conclusio: Vor allem im Zusammenhang mit kulturnegativen IE-Fällen aufgrund von anspruchsvollen Mikroorganismen, welche sich mit konventionellen Methoden schwer oder gar nicht kultivieren lassen, zeigte sich die 16S rRNA Sequenzierung als eine nützliche Methode für den Erregernachweis. Die 16S rRNA sollte als ergänzende Methode in die Diagnostik der IE aufgenommen werden, kann aber konventionelle Diagnostikmethoden (Blutkulturen, Klappenkulturen, Serologie, Histologie) nicht ersetzen.

Abstract

Background: Infective endocarditis (IE) is a rare but potentially life-threatening disease which despite of the considerable improvement in the past decades regarding to the diagnostics and therapy shows a 1-year-mortality of about 30%. The detection of the causative microorganism is crucial to ensure an appropriate and targeted therapy. Conventional microbiological diagnostic methods like bloodcultures remain negative in up to 31% of IE-cases. The aim of this thesis was to compare 16S rRNA sequencing as a culture-independent method with conventional diagnostic methods of IE with respect to the detection of the causative microorganism.

Methods: A retrospective analysis of data from 21 patients was performed. All patients underwent a heart valve operation in the Clinical Division for Cardiac Surgery of the Medical University of Graz between April 2009 and November 2014. The removed heart valve tissue was used for the detection of the pathogen using 16S rRNA sequencing. The results from 16S rRNA sequencing were compared with those from conventional diagnostic methods of IE (blood culture, valve culture, serologic tests, histologic examination of the valve tissue).

Results: In 13 of 21 cases (61,9%) the results from 16S rRNA sequencing were in line with the results from the other diagnostic methods with regards to the detection of the causative agent. In 9 of these 13 cases the diagnosis IE was confirmed and the causative pathogen was identified clearly. In 4 of the 13 consistent cases IE was rejected, thus they served as negative controls. In one of the 21 cases (4,8%) the causative agent could be identified only by 16S rRNA. 6 of the 21 (28,6%) cases were classified "unclear" for different reasons. In one of the 21 cases (4,8%) the 16S rRNA failed to identify the causative agent.

Conclusion: Especially in culture-negative IE-cases due to fastidious bacteria 16S rRNA sequencing turned out to be a useful method in the detection of the causative agent. This culture-independent molecular technique should be included as an additional method in the diagnostics of IE, however, it cannot replace conventional methods (bloodcultures, tissue culture, serology, histology).

1 Einleitung

1.1 Infektiöse Endokarditis

1.1.1 Allgemeines

Die IE wurde vor mehr als hundert Jahren von Sir William Osler systematisch beschrieben und gilt auch heute noch als eine schwerwiegende und potentiell tödliche Erkrankung mit einer Letalität von 20-30% (1,2). Sie ist vergesellschaftet mit einem verlängerten Krankenhausaufenthalt, beeinträchtigt die Lebensqualität und benötigt nicht selten einen operativen Eingriff als therapeutische Maßnahme (3,4). Bei diesem Krankheitsbild kommt es zu einer mikrobiellen (meist bakteriellen) Infektion des Endokards mit bevorzugter Besiedelung der (linksventrikulären) Herzklappen, wenn auch jede andere Stelle des Endokards betroffen sein kann (5).

Die IE ist keine einheitliche Erkrankung und kann sich in verschiedenen Formen präsentieren. Von der akuten, foudroyantverlaufenden Form mit rascher Zerstörung kardialer Strukturen und hämatogener Aussaat bis hin zur subakuten, schleichend verlaufenden Endokarditis (6,7). Trotz des beachtlichen medizinischen Fortschrittes hinsichtlich Diagnostik und Therapie in den letzten 30 Jahren, haben sich die Zahlen, bezogen auf die Mortalität nicht wesentlich verändert. Die 1-Jahres-Mortalität beträgt heute etwa 30% (8). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Mortalität im Krankenhaus niedriger war als die 1-Jahres Mortalität (9–11). Die Höhe der Mortalität ist abhängig von den Risikofaktoren der PatientInnen, den auslösenden Erregern, den Komplikationen der IE und den diagnostischen Ergebnissen wie zum Beispiel dem echokardiographischen Befund (12).

Die Erkrankung zeigt eine Änderung des epidemiologischen Profils (vor allem in der westlichen Welt) bezogen auf das Patientenkollektiv, die zugrundeliegenden Mikroorganismen und die prädisponierenden Faktoren. Während früher junge Menschen mit rheumatisch bedingten Herzerkrankungen betroffen waren, sind es heute vor allem ältere PatientInnen, PatientInnen mit intrakardialen Fremdkörpern wie zum Beispiel künstlichen Herzklappen oder Schrittmachern und degenerativen Herzerkrankungen. Weitere Risikofaktoren sind intravenöser Drogenmissbrauch

und die Zunahme invasiver Eingriffe an PatientInnen (=behandlungsassoziierte Infektionen) (3,7,8). Hinzu kommen Änderungen im Erregerprofil durch Zunahme der Staphylokokkeninfektionen (13,14).

Wegen der Variabilität und Inhomogenität der klinischen Präsentation und des Verlaufs der IE sollte diese Erkrankung möglichst interdisziplinär durch ein gemeinsames Vorgehen von KardiologInnen, HerzchirurgInnen, MikrobiologInnen und InfektiologInnen, wie auch in Zusammenarbeit mit anderen Fachdisziplinen (Neurologie, Pathologie, Radiologie) behandelt werden (1).

1.1.2 Pathophysiologie und Pathogenese

Das gesunde Endothel des Herzens ist dadurch gekennzeichnet, dass es gegenüber den meisten bakteriellen Infektionen und Kolonisationen unempfindlich ist und eine Thromboresistenz aufweist. Thromboresistenz bedeutet, dass es unter normalen Umständen durch strömendes Blut zu keiner wesentlichen Aktivierung des Gerinnungssystems und der Thrombozyten kommt. Dafür verantwortlich sind die antithrombotischen Eigenschaften eines intakten Endothels. Ein solches intaktes Endothel stellt somit sicher, dass unter physiologischen Bedingungen keine wesentliche Gerinnselbildung stattfindet. Wird aber dagegen das Endothel geschädigt, beispielsweise an Stellen mit einer hohen Blutflussgeschwindigkeit oder auch an Stellen mit niedrigem Druck in unmittelbarer Nähe zu strukturellen Herzdefekten, kann es durch den dortigen, turbulenten Blutfluss direkt zu einer Infektion durch Pathogene kommen, oder vorerst einmal zur Bildung eines sterilen Thrombus aus Fibrin und Thrombozyten. Letzteres wird dann als nicht bakterielle thrombotische Endokarditis bezeichnet (NBTE) (7,15). Ein solcher steriler Thrombus entsteht im Rahmen einer mechanischen Endothelschädigung und ist Teil eines normalen Heilungsprozesses, begünstigt jedoch auch das Anheften von Bakterien während einer transienten Bakteriämie. Dabei kommt es im Bereich der Endothelschädigung zur Präsentation von extrazellulären Matrixproteinen, Produktion von TissueFactor und Ablagerung von Fibrin und Thrombozyten. Häufige Auslöser einer NBTE und einer Endothelschädigung sind Mitral- und Aortenklappeninsuffizienz, Aortenstenose, Ventrikelseptumdefekt und komplexe angeborene Vitien. Ursachen für diese genannten Anomalien sind rheumatische

Herzerkrankungen (häufiger in Entwicklungsländern zu finden- mit abnehmender Tendenz in den Industriestaaten), Entzündungen, minimal invasive Eingriffe, Mitralklappenprolaps und degenerative Herzerkrankungen, wie zum Beispiel Arteriosklerose. Oft beginnt eine bakterielle Endokarditis auch auf implantierten Geräten (ICD, Herzschrittmacher), Herzklappenprothesen oder sonstigen Implantations- und Nahtstellen am Herzen. So kann gesagt werden, dass eine infektiöse Endokarditis meistens an geschädigten Herzklappen auftritt. Ist jedoch die Resistenz eines Individuums stark herabgesetzt (bei stark konsumierenden Erkrankungen, Alkoholismus, Marasmus etc.), können auch nicht vorgeschädigte Herzklappen und das murale Endokard betroffen sein. Der Krankheitsprozess wird einerseits durch die Virulenz des Erregers und andererseits durch die Resistenz des Organismus bestimmt (7,16,17).

Damit nun eine IE entstehen kann, müssen Erreger über Schleimhäute, Haut oder lokale Infektionen in die Blutbahn gelangen und im Rahmen einer transienten Bakteriämie an thrombotischem Material (NBTE) adhärieren. Eine Ausnahme bilden sehr virulente Erreger, wie *Staphylococcus aureus*, welche direkt an intaktem Endothelgewebe ohne vorausgegangene Herzklappenschädigung anhaften können (18,19). Dort beginnen die Erreger, falls sie die bakterizide Aktivität des Serums und die antimikrobiellen Peptide der Thrombozyten überleben, zu proliferieren und induzieren einen lokalen prokoagulatorischen Zustand. Fibrinablagerungen verbinden sich mit Thrombozytenaggregaten und bilden Vegetationen. Die Adhäsion der Erreger wird durch Adhäsionsmoleküle, Fibronectin-bindende Proteine (auf grampositiven Bakterien) (20), den Clumping Factor (auf *S.aureus*) sowie Glukane und FimA (auf Streptokokken) unterstützt. Um die angehefteten Bakterien herum bildet sich ein Schutzfilm aus Fibrin und Thrombozyten. So können sich die Erreger der körpereigenen Immunantwort entziehen und proliferieren zu dichten Mikrokolonien. Jene Bakterien, welche sich in der Tiefe der Vegetation befinden, sind metabolisch inaktiv und somit gegenüber einer Antibiotikatherapie weitgehend resistent. Erreger an der Oberfläche der Vegetation proliferieren und werden kontinuierlich ins vorbeiströmende Blut freigesetzt (7).

Als Folgeerscheinung einer IE kann es zur Embolisierung durch Fragmente von Vegetationen kommen, welche zur Infektion oder Infarzierung entfernter Gewebsregionen führen. Darüber hinaus kann es zur hämatogenen Streuung der Erreger während Bakteriämien, sowie zur Zerstörung und Schädigung des Gewebes

durch Ablagerung von Immunkomplexen (bei Verschleppung bakterieller Antigene) kommen (7).

Transiente Bakteriämie

Damit eine IE überhaupt entstehen kann, sind die Anwesenheit von Erregern im Blut (Bakteriämie) und Endokardanomalien mit Verlust der Thromboresistenz notwendig. Ausgangspunkte für Bakteriämien sind oft die dicht besiedelte Mundschleimhaut (besonders am Zahnfleisch). Weitere Eintrittspforten für Erreger sind Hautdefekte und Entzündungsprozesse im Darmtrakt und Urogenitalsystem. Zunehmende Bedeutung kommt jenen Bakteriämien zu, welche durch diagnostische oder therapeutische Interventionen hervorgerufen werden (5). Risikofaktoren für die Entstehung nosokomialer Bakteriämien sind zentrale Venenkatheter, arterielle Katheter und implantierbare Geräte wie Herzschrittmacher. Intravenöser Drogenabusus ist ebenfalls ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Bakteriämie (21–23).

Wie bereits erwähnt kann es durch invasive Prozeduren zur Entstehung von transienten Bakteriämien kommen. Die Rolle einer transienten Bakteriämie wurde in Studien mit Ratten, bei denen es zu einer katheterinduzierten NBTE und zur Ausbildung von Vegetationen an der Aortenklappe kam, untersucht. Jene Tiere mit Zahnfleischentzündung und Manipulation im Bereich der Zähne entwickelten öfter eine IE (24,25). Ob es nun im Rahmen solcher invasiven Eingriffe zum Ausbruch einer IE kommt, hängt vom Ausmaß und von der Dauer der Bakteriämie, von den Risikofaktoren (vorgeschädigte Herzklappe etc.) des betroffenen Individuums und von der Adhärenzfähigkeit des Erregers ab. Transiente Bakteriämien entstehen aber nicht nur bei invasiven Prozeduren (zahnärztliche, urologische, gynäkologische und andere Eingriffe und Behandlungen), sondern auch im Alltag beim Abtrocknen mit Handtüchern, Zähneputzen, und Kauen. Solche spontanen Bakteriämien sind meist von geringem Ausmaß (1-100 colony-formingunits/ml Blut) und von kurzer Dauer (weniger als 10 Minuten (18)). Eine gute Mundhygiene ist eine wichtige Präventionsmaßnahme (18).

Obwohl transiente Bakteriämien häufig auftreten, ist die Inzidenz der IE niedrig. Das heißt, dass die Elimination der Erreger aus dem Blut effektiv ist. Sind jedoch die passenden Risikofaktoren (Herzklappenveränderungen, Immunsuppression)

vorhanden, kann eine solche transiente Bakteriämie der erste Schritt in Richtung der Entstehung einer IE sein (26–29).

1.1.3 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 2-11 Episoden pro 100.000 Personenjahre ist die IE eine seltene Erkrankung. Es zeigt sich ein Anstieg der Inzidenzrate mit zunehmendem Alter (über 50 Jahre), wobei die höchsten Inzidenzraten mit 14,5 Episoden pro 100.000 Personenjahre zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr berichtet werden (9). Die Geschlechterverteilung betreffend, sind laut den meisten epidemiologischen Studien Männer häufiger betroffen als Frauen ($\text{♂}:\text{♀} = 2:1$) (9,13,16,18,28,30–32). Eine weitere Studie, welche Daten von PatientInnen über 30 Jahre sammelte, hat einen deutlichen Anstieg der Inzidenz bei Frauen gezeigt, während die Inzidenz bei Männern relativ stabil geblieben ist (33).

IE im Kindesalter ist selten und findet sich häufiger bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, wie Fallot'sche Tetralogie und Pulmonalarterienatresie, und intrakardialen Fremdkörpern. Ein Geburtsalter unter 37 Schwangerschaftswochen ist ebenfalls ein Risikofaktor für die Entwicklung einer IE bei Neugeborenen. Als häufigste Erreger erwies sich *S.aureus* (34,35).

In den westlichen Industriestaaten waren die epidemiologischen Eigenschaften der IE in den letzten Jahrzehnten kontinuierlichen Veränderungen unterworfen. Man beobachtet eine Verlagerung der prädisponierenden Faktoren von den rheumatisch bedingten Herzerkrankungen hin zu degenerativen Herzklappenschädigungen, intrakardialen Fremdkörpern, Malignomen, Diabetes mellitus, nosokomialen Infektionen (healthcare-associated IE) und intravenösem Drogengebrauch. 10-30% der Endokarditiden betreffen Herzklappenprothesen (7,36). Ein systematischer Rückblick über bevölkerungsrepräsentative Studien bezüglich IE zeigte eine Abnahme der IE-Patientenzahl mit rheumatisch bedingten Herzerkrankungen und eine Zunahme der IE-Patienten, welche einer Herzklappenoperation unterzogen wurden. Untersucht und verglichen wurden 15 Studien mit 2.371 IE Fällen aus 7

Ländern von 1969 bis 2000 (37). Dieser Trend wird in den Industriestaaten beobachtet. In Entwicklungsländern und weniger industrialisierten Staaten sind rheumatische Herzerkrankungen noch immer die vorherrschende Ursache einer IE. Diese Tatsache ist wahrscheinlich durch die Kombination aus dem Mangel an medizinischen Ressourcen und fehlender Infrastruktur einerseits und politischer, ökonomischer und sozialer Instabilität, Armut, erhöhter Bevölkerungsdichte und Mangelernährung andererseits bedingt (38,39).

Früher war die IE eine Erkrankung junger Menschen mit meist rheumatisch bedingten Herzklappenveränderungen, während sie heute eine Erkrankung älterer Menschen ist. In einer großen, multizentrischen Studie aus dem Jahr 2009 mit 2781 Patienten mit definitiver IE, betrug das mittlere Alter 57,9 Jahre (40). Eine andere Studie aus dem Jahr 2006 mit 193 Patienten zeigte ein mittleres Alter von 67 Jahren (41).

Healthcare-associated Endokarditiden werden am häufigsten durch *S.aureus* verursacht. Während die häufigsten Erreger der community-acquired IE noch immer Streptokokken der Viridans-Gruppe sind (beide bezogen auf IE nativer Herzklappen bei Patienten ohne intravenösem Drogengebrauch in der Geschichte) (42,43).

Unter einer healthcare-associated IE versteht man das Auftreten von Symptomen einer IE nach 48h nach Aufnahme in ein Krankenhaus, oder eine IE, welche mit einem invasiven Eingriff (intravenöse Therapie, Venenverweilkatheter, Hämodialyse, invasive Eingriffe in Ambulatorien etc.) in den letzten 6 Monaten vor Diagnosestellung einhergeht (44,45). Eine community-acquired IE ist definiert durch das Auftreten von Symptomen einer IE, welche zum Zeitpunkt der Aufnahme in ein Krankenhaus oder unter 48h nach Krankenhausaufenthalt auftreten und nicht die Kriterien einer healthcare-associated IE erfüllen (44).

Die IE betrifft bevorzugt die linksventrikulären Herzklappen. Eine Erklärung dafür findet sich darin, dass im linken Herzen höhere Drücke herrschen und dadurch leichter Turbulenzen im Blutfluss entstehen, welche eine Thrombusbildung begünstigen. Darüber hinaus ist das linke Herz dadurch gekennzeichnet, dass das Blut sauerstoffreicher ist und das Wachstum der meisten Erreger dadurch erleichtert wird (46). In einer prospektiven Studie mit 2781 Patienten mit definitiver IE wird berichtet, dass die Mitralklappe mit 41,1 % die am häufigsten befallene Herzklappe

ist, gefolgt von der Aortenklappe mit einem Anteil von 37,6 %. Die Pulmonalklappe ist mit 1 % die am seltensten betroffene Herzklappe und die Trikuspidalklappe hat einen prozentuellen Anteil von 12% (40,47).

Eine rechtsventrikuläre IE findet sich etwa in 5-10 % der Fälle (48). PatientInnen mit dem Risikoverhalten des intravenösen Drogengebrauchs sind am häufigsten gefährdet eine Rechtsherzendokarditis infektiöser Genese zu entwickeln. Dabei ist die Trikuspidalklappe am häufigsten befallen (46,47).

Bezogen auf den Verlauf der IE, kann diese eingeteilt werden in (49):

- a) Akute Endokarditis: Diese Form entsteht im Rahmen einer Bakteriämie mit Mikroorganismen hoher Virulenz und weist meist einen dramatischen Verlauf auf.
- b) Endocarditisulcerosa: Hier kann es zu ausgeprägten Schädigungen auch an intakten Herzklappen kommen.
- c) Subakute Endokarditis (= Endocarditislenta): Diese Form entsteht meist an vorgeschädigten oder prothetischen Herzklappen durch Erreger niedriger Virulenz und macht sich durch einen schleichenden, schubweisen Verlauf (> sechs Wochen) bemerkbar.

Wichtig für den klinischen Verlauf und somit für eine klinisch relevante Klassifikation sind Lokalisation, Aktivitätsstatus, Akquisition, Beteiligung von Fremdmaterial und der zugrunde liegende Erreger (1). Für den zeitlichen Verlauf der Erkrankung ist in den meisten Fällen die Art des Erregers von entscheidender Bedeutung. Erreger wie β -hämolysierende Streptokokken, *S. aureus* und Pneumokokken sind mit einem akuten Verlauf assoziiert. Für einen schleichenden (subakuten) Verlauf sind Streptokokken der Viridans-Gruppe und HACEK-Keime (*Haemophilus* Spezies., *Aggregatibacter* Spezies, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella* Spezies, und *Kingella* Spezies) verantwortlich. Letztendlich gibt es aber auch Erreger wie Enterokokken und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS), welche mit beiden Formen vergesellschaftet sind. Exotischere Keime, wie *Bartonella* Spezies und *Coxiella burnetii* sind durch einen außerordentlich schleichenden Verlauf gekennzeichnet (7,16).

Eine weitere Klassifizierung der IE findet sich in der folgenden Tabelle, basierend auf den Guidelines der European Society of Cardiology (ESC) 2009.

Tabelle 1: Klassifikation der infektiösen Endokarditis laut den ESC-Guidelines (aus (11))

<p>• IE abhängig von der Lokalisation und dem Vorhandensein von Kunstklappen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Linksseitig Naturklappen IE - Linksseitige Kunstklappen IE (KKE) <ul style="list-style-type: none"> - Frühe KKE: < 1 Jahr nach der Klappenoperation - Späte KKE: > 1 Jahr nach der Klappenoperation - Rechtsseitig IE - Fremdmaterial-assoziierte IE (Schrittmacher, Kardioverter-Defibrillator) 	
<p>• IE abhängig von Art der Akquisition</p> <ul style="list-style-type: none"> - Health-careassociated IE - Community-acquired IE - Intravenous drug abuse-associated IE: IE bei intravenös Drogenabhängigen ohne alternative Quelle der Infektion 	
<p>• Aktive IE (einer der folgenden Punkte muss erfüllt sein)</p> <ul style="list-style-type: none"> - IE mit persistierendem Fieber und positiven Blutkulturen - Morphologische Zeichen einer aktiven Entzündung im Rahmen einer Operation - Laufende antibiotische Therapie - Histopathologischer Nachweis einer aktiven IE 	
<p>• Wiederholte IE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rezidiv: Wiederholte Episoden einer IE verursacht durch den selben Keim < 6 Monate nach der Erstinfektion - Re-Infektion: Infektion mit einem anderen Mikroorganismus oder wiederholte Episoden einer IE verursacht durch den selben Keim > 6 Monate nach der Erstinfektion 	

Abkürzungen: IE= infektiöse Endokarditis

1.1.4 Klinik / Symptomatik

Die klinischen Erscheinungen und Symptome der IE sind, wie die das gesamte Krankheitsbild, heterogen und umfassen das gesamte Spektrum akuter und subakuter Verlaufsformen. Präsentieren kann sich die IE als akute, schnell fortschreitende Infektion oder als subakute oder chronische Erkrankung mit niedrigem Fieber und unspezifischen Symptomen. Damit es zu einer schnellen Diagnosestellung kommt, sollte frühzeitig ein(e) Kardiologe/ Kardiologin und ein(e)

Infektiologe/Infektiologinherangezogen werden, da viele andere Erkrankungen als Ursache der Symptome in Frage kommen könnten (chronische Infektionen, Malignome, Autoimmunerkrankungen etc.).

Bei der Mehrheit der Betroffenen finden sich lang anhaltende, sonst nicht erklärbare Temperaturanstiege, wobei das Fieber bei älteren und stark geschwächten (immunsupprimierten) PatientInnen geringer ausfallen oder sogar fehlen kann. Meist findet sich bei der akuten Form der IE eine Körpertemperatur zwischen 39,4° und 40°C (7). Weitere Symptome sind Schüttelfrost, Abgeschlagenheit, Arthralgien, Rückenschmerzen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, nächtliche Schweißausbrüche und Tachykardien (6,7,17,47,50,51). Entwickelt ein(e) Patient/-in eine Sepsis unklarer Genese, sollte an die Möglichkeit des Vorliegens einer IE gedacht werden. Vor allem dann, wenn zusätzliche Risikofaktoren vorliegen. Eine Sepsis kann sich unterschiedlich manifestieren, angefangen von generellem Unwohlsein bis hin zum septischen Schock, und ist von der Virulenz des Erregers, dem Immunstatus und den Risikofaktoren des betroffenen Individuums abhängig (52,53).

Bei 85% der PatientInnen findet sich im Rahmen der IE im fortgeschrittenen Stadium ein Herzgeräusch. Entweder tritt dieses durch die Veränderung der Herzklappen unter der Infektion neu auf oder aber es kommt zu einer Änderung des Auskultationsbefundes bei vorbestehender Herzerkrankung (= Entwicklung oder Verstärkung einer Klappeninsuffizienz). In einer großen prospektiven Studie mit 2781 PatientInnen trat in 48% der Fälle ein neues Herzgeräusch auf und in 20% der Fälle kam es zu einer Verstärkung eines bereits bestehenden Herzgeräusches (40). In 30-40 % der Fälle findet sich eine begleitende Herzinsuffizienz als Folge der Klappendestruktion. Jedoch kann eine Herzinsuffizienz auch das Resultat einer Endokarditis-assoziierten Myokarditis oder einer intrakardialen Fistel sein (7,16,17). Ein weiteres klinisches Merkmal der IE ist das Auftreten von Petechien und septischer Embolien unterschiedlicher Größe. Vegetationen mit einem Durchmesser über 10mm embolisieren häufiger als kleinere Vegetationen. Eine multizentrische Studie mit 384 PatientInnen zeigt, dass 34% der Betroffenen zumindest ein embolisches Ereignis im Rahmen der IE hatten (10). Mikroembolien treten auf der Mund- und Rachenschleimhaut, in den Konjunktiven, im Augenhintergrund und in Form von Splinter- Hämorrhagien als Einblutungen unter den Fingernägeln auf.

Ebenfalls zu den vaskulären Phänomenen gehören Janeway- Läsionen. Diese sind nicht schmerzhaft, fleckförmig-erythematöse Läsionen im Bereich der Palmarflächen oder Fußsohlen. Außerdem kann bei Nierenbeteiligung, als Konsequenz der Löhlein- Herdnephritis, eine Mikrohämaturie auftreten. Als Folge größerer septischer Embolien (können mittlere und kleinere Arterien jeder Lokalisation betreffen) kann es zu Infarkten und über sogenannte "mykotische" Aneurysmen zu Gefäßrupturen kommen. Die Infarzierungen können das Gehirn, die Milz, die Nieren, die Lunge, den Darm und die Extremitäten betreffen (7,12,17,47). Bei längerem Verlauf der IE beobachtet man das Auftreten immunologischer Phänomene, wie zum Beispiel Osler-Knötchen. Dabei handelt es sich um schmerzhaft, stecknadelgroße, rötliche Knötchen im Bereich der Finger und Zehen. Sie sind Ausdruck einer infekta allergischen Kapillarentzündung. Eine Studie aus dem Jahr 2009 mit 2781 PatientInnen mit definitiver IE zeigt, dass Osler-Knötchen in 3% und Janeway-Läsionen in 5% der IE-Fälle vorkommen (40). Darüber hinaus können Kryoglobulien und Perikarditiden vorliegen. Eine Splenomegalie ist in etwa 11 % (40) der IE-Fälle nachweisbar (7,12,17,47).

Abbildung 1: Splinter-Blutung



Obwohl die oben genannten Hautläsionen in Lehrbüchern ausführlich beschrieben werden, findet man sie heutzutage seltener aufgrund der schnelleren Diagnosestellung der IE. Treten jedoch spezifische Hautläsionen bei Betroffenen im Rahmen einer IE auf, so ist das Risiko der Entwicklung IE-assoziiertes extrakardialer Komplikationen (cerebrale und extracerebrale Embolien) höher (54). Häufiger beobachtet man die Folgen einer IE in Form von Herzinsuffizienz, Schlaganfällen oder lokalen, septisch-embolisch bedingten Infektionen (periphere Abszesse) (7,36).

1.1.5 Ätiologie

Die häufigsten Erreger einer IE sind Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken. Etwa 80% der infektiösen Endokarditiden werden durch grampositive Erreger verursacht. Das Erregerspektrum der IE hat sich in den vergangenen Jahren, vor allem in den westlichen Industriestaaten, etwas geändert. Man beobachtet eine Zunahme der Infektionen mit *S. aureus*, welche in großen, multizentrischen Studien bestätigt wird (40)(14). Die Ergebnisse aus diesen Studien zeigen Staphylokokken als Nummer Eins im Erregerspektrum bakterieller Endokarditiden. Eine Erklärung dafür findet sich in der vermehrten Durchführung invasiver Eingriffe im Rahmen eines Krankenhaus- oder Ambulanzaufenthaltes. Andererseits werden in vielen Lehrbüchern noch immer Streptokokken als die häufigsten verursachenden Mikroorganismen einer IE genannt. Auch Mischinfektionen werden immer häufiger beobachtet. In bis zu 31 % (55) der Fälle kommt es vor, dass Erreger in Blutkulturen nicht gefunden und identifiziert werden können. Einerseits ist dies durch eine vorausgegangene Antibiotikatherapie bedingt, durch welche die Keime abgeschwächt werden, und so nicht mehr nachweisbar sind (meistens handelt es sich hier um Streptokokken oder KNS (16)). Andererseits gibt es seltenere, besonders langsam wachsende oder intrazelluläre Keime (*Coxiella burnetii*, HACEK-Keime, Chlamydien, Neisserien, Bartonellen, Pilze etc.), welche sich schwer oder gar nicht in der Blutkultur nachweisen lassen (7,17,18,40).

In Abhängigkeit von der Eintrittspforte zum Beispiel, variieren die auslösenden Mikroorganismen einer IE. Streptokokken der Viridans-Gruppe, Staphylokokken und HACEK-Keime gelangen über die Mundhöhle, Haut und obere Luftwege in den Blutkreislauf und können eine ambulant erworbene Endokarditis auf nicht vorgeschädigten Herzklappen verursachen. Enterokokken sind Vertreter der gesunden gastrointestinalen Flora und gelangen meistens über den Urogenitaltrakt in die Blutbahn, während *Streptococcus bovis* aus dem Gastrointestinaltrakt stammt (7)(17)(36).

Nosokomiale Endokarditiden, welche native und nicht vorgeschädigte Herzklappen betreffen sind in 6-25% eine schwerwiegende Folge katheterassoziierter Bakteriämien durch *S. aureus*. Sie entstehen seltener über Bakteriämien

ausgehend von Wunden und Harnwegsinfekten. Endokarditiden der künstlichen Herzklappe, welche innerhalb von zwei Monaten nach der Operation entstehen, sind meist die Folge einer intraoperativen Kontamination der Prothese oder einer postoperativen Bakteriämie. Die häufigsten Erreger sind in diesem Fall KNS, *S. aureus*, Diphtheroide, fakultative gramnegative Bazillen und Pilze (7).

Staphylokokken

Staphylokokken betreffend, sollte im Rahmen einer Bakteriämie zwischen *S. aureus* und KNS unterschieden werden. Eine prospektive multizentrische Studie hat gezeigt, dass eine Bakteriämie, welche durch *S. aureus* verursacht wurde, in 13% der Fälle zu einer Endokarditis führte. Patienten mit einer community-acquired-*S. aureus*-Infektion entwickelten sogar in 21 % der Fälle eine IE (56). Damit steht fest dass eine Infektion mit *S. aureus* ein großes Risiko für die Entwicklung einer IE mit sich bringt und dementsprechend gehandhabt werden muss (Durchführung einer transthorakalen bzw. transösophagealen Echokardiographie bei nachgewiesener *S. aureus*-Bakteriämie). *S. aureus* befällt traditionellerweise eher native Herzklappen und KNS eher prothetische Herzklappen. Jedoch wird in Studien beschrieben, dass *S. aureus* heute der häufigste Erreger der IE in den Industriestaaten ist, auch die künstlichen Herzklappen betreffend (12,14,40). Hinzu kommt, dass im Zusammenhang mit *S. aureus*-Infektionen häufiger Insulte, Embolien und persistierende Bakteriämien beobachtet werden (14). Umgekehrt gibt es Studien, welche zeigen, dass KNS auch native Herzklappen befallen können (57,58).

KNS sind Bewohner der normalen Hautflora. Daher werden sie oft im Rahmen von invasiven Eingriffen über die Haut in die Blutbahn verschleppt und können Kolonien an intravenösen Verweilkanülen und anderen Fremdkörpern bilden. Infektionen, welche innerhalb eines Jahres nach Herzklappenersatz mittels künstlicher Herzklappe entstehen, werden am häufigsten durch KNS verursacht (59–61). Besonders hervorzuheben unter ihnen ist *S. lugdunensis*. Dieser Keim ist besonders pathogen und mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert (12). Darüber hinaus kennzeichnen sich Infektionen mit KNS durch eine hohe Rate an Abszessbildungen und vielfacher Resistenzbildung gegenüber Antibiotika (62).

S. aureus und KNS (vor allem *S. epidermidis*) sind die häufigsten verursachenden Mikroorganismen einer IE bei implantierten elektronischen Geräten wie Herzschrittmachern und Defibrillatoren (63,64).

Streptokokken

Orale Streptokokken (= vergrünende Streptokokken oder Streptokokken der Viridans- Gruppe) umfassen viele Spezies wie *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* und *Gemella morbillorum*. Sie gehören zur normalen Mund- und Rachenflora und können im Rahmen kleiner Verletzungen in die Blutbahn gelangen und damit eine Bakteriämie verursachen. Darüber hinaus gibt es noch die *Streptococcus milleri*- oder *Streptococcus angiosus*- Gruppe (*S. angiosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus*). Die Vertreter dieser Gruppe werden hervorgehoben, da sie häufig zur Bildung von Abszessen und zur hämatogenen Aussaat neigen und somit eine längere Therapiedauer benötigen. Als Drittes sollendie Streptokokken der Gruppe D mit *S. gallolyticus* und *S. bovis* als Vertreter genannt werden. Wird in der Blutkultur ein *S. bovis* identifiziert, sollte eine Abklärung auf eventuelle Kolontumoren und -polypen erfolgen, da diese als Eintrittspforte dienen können. In der Regel sind Streptokokken sensibel auf Penicillin G und haben eine Heilungsrate von mehr als 90%, somit ist ihre Prognose deutlich besser als die von *S.aureus* bedingten Infektionen. Streptokokken sind die häufigsten Erreger einer IE in Entwicklungsländern (1,12,16,36,65).

Enterokokken

Enterokokken sind für 10% aller infektiösen Endokarditiden verantwortlich (40). Die häufigsten zwei Vertreter unter ihnen sind *E. faecalis* (91%) und *E. faecium* (4%) (66). Eine Studie aus dem Jahr 2013 zeigte im Rahmen einer Enterokokken-IE in Nordamerika eine 1-Jahers Mortalität von 28,9%. Das betroffene PatientInnenkollektiv sind ältere Männer und chronisch Kranke (66). *E.faecalis* befällt Nativ- und Kunstklappen (67).

Seltene Erreger

Deutlich seltenere Mikroorganismen, welche eine IE verursachen, sind Erreger aus der Gruppe der HACEK-Keime (*Haemophilus* Spezies, *Aggregatibacter* Spezies, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella* Spezies) und Pilze. Erstere führen, laut einer multizentrischen Studie mit 5591 IE- PatientInnen lediglich in 1,4% der Fälle zu einer Endokarditis und haben meist einen unkomplizierten Verlauf und ein sehr gutes Outcome mit einer Krankenhaus-Mortalität von etwa 4 %. Die

HACEK-Keime befallen häufiger künstliche Herzklappen und betreffen vor allem jüngere Patienten (< 61 Jahren). An erster Stelle der Auslöser einer IE aus der HACEK-Gruppe steht *Haemophilus* Spezies, gefolgt von *Aggregatibacter* Spezies und *Cardiobacterium hominis* (68).

Pilze als Verursacher einer IE machen nur einen kleinen Anteil aus (1,3%), haben aber oft einen tödlichen Ausgang. Am häufigsten kommt es zu einer Infektion mit *Candida* Spezies (48%) und *Aspergillus* Spezies (24%). Risikofaktoren für eine Pilzinfektion sind eine Immunsuppression nach Herzklappenoperationen. Die Mortalitätsrate von 72% ist durch eine verzögerte oder verfehlte Diagnosestellung und langbestehende Symptome mit verspäteter Einweisung ins Krankenhaus bedingt (69,70).

Darüber hinaus gibt es noch einige Erreger, welche selten eine IE auslösen können. Hier wären solche Mikroorganismen zu nennen, welche im Rahmen von Zoonosen zu einer IE führen können: *Coxiella burnetii* und *Brucella* Spezies (beide durch Rinder, Ziegen und Schafe übertragen), *Bartonella henselae* (Übertragung durch den Katzenfloh), *Chlamydia psittaci* (Übertragung durch Vögel) und *Bartonella quintana* (Übertragung durch die menschliche Kleiderlaus). Deswegen ist es bei negativen Blutkulturen und bestehendem Verdacht auf IE hier sinnvoll nach Tierkontakten in der Geschichte der PatientInnen zu fragen und serologische Untersuchungen durchzuführen. *Coxiella burnetii* ist der Auslöser des Q-Fiebers, welches eine steigende Inzidenz zeigt und in seltenen Fällen eine IE auslösen kann. Deshalb wurde eine positive Serologie auf *C.burnetii* als mikrobiologisches Kriterium in die modifizierten Duke-Kriterien aufgenommen (12,71–73).

Zum Schluss werden noch einige, besonders seltene Auslöser der IE genannt: *Acinetobacter* Spezies, *Pseudomonas aeruginosa*, Mycoplasmen, Legionellen, *Tropheryma whipplei*, Clostridien, *Moraxella* Spezies u.v.m. (71).

1.1.6 Diagnostik

Neben dem klinischen Erscheinungsbild sind die Echokardiographie und mikrobiologische Tests die Grundsäulen in der Diagnostik der IE. Die Diagnose IE kann nur gesichert werden, wenn Vegetationen aus Operationspräparaten,

Obduktionsmaterial oder aus Blutgefäßen (Embolus) mikrobiologisch und histologisch untersucht werden. Ungeachtet dessen und aufgrund der Variabilität der klinischen Erscheinungen und zum Teil schwieriger Diagnosestellung dieser Erkrankung, wurden die sogenannten Duke-Kriterien als sehr sensitives und spezifisches (Sensitivität und Spezifität > 80%) Diagnoseschema bei Verdacht auf IE entwickelt. In diesen Kriterien werden klinische, laborchemische (mikrobiologische) und echokardiographische Befunde berücksichtigt. Bei einem Nachweis von zwei Hauptkriterien, einem Haupt- und drei Nebenkriterien oder fünf Nebenkriterien kann die Diagnose einer IE gestellt werden. Wenn die Diagnose einer IE weder bestätigt, noch verworfen werden kann, ist die Erkrankung als mögliche IE anzusehen (sofern ein Haupt- und ein Nebenkriterium oder drei Nebenkriterien vorliegen) (7,47,74). Eine Modifizierung der ursprünglichen Duke-Kriterien aus dem Jahr 1994 (75) wurde durchgeführt und diese erweiterten Diagnosekriterien werden heute im klinischen Alltag verwendet. In den modifizierten Duke-Kriterien wurde zum Beispiel eine positive Blutkultur auf *C.burnetii* als eines der Hauptkriterien aufgenommen (76). Die Duke-Kriterien zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität (>80 %) (74), eine ausgezeichnete Spezifität (99%) (77) und durch einen hohen negativen prädiktiven Wert (78) aus.

Tabelle 2: Modifizierte Duke-Kriterien (aus (79))

Hauptkriterien
<p>Mikrobiologische Kriterien einer IE</p> <p>- Nachweis von IE typischen Erregern in zwei separaten Blutkulturen: Viridans Streptokokken, <i>Streptokokkus bovis</i>, HACEK-Gruppe, <i>Staphylokokkus aureus</i>, community-acquired Enterokokken ohne primären Fokus</p> <p style="text-align: center;"><i>ODER</i></p> <p>- Persistierend positive Blutkulturen mit anderen Mikroorganismen vereinbar mit einer IE: Mindestens in zwei positiven Blutkulturen aus unterschiedlichen Blutabnahmen mit mindestens 12 Stunden Abstand In allen 3 Blutkulturen oder in der Mehrheit aus von mindestens 4 Blutkulturen, wobei die erste und letzte mit einem Zeitabstand von mindestens 1 Stunde abgenommen wurden</p> <p style="text-align: center;"><i>ODER</i></p> <p>- Eine einzelne positive Blutkultur mit <i>Coxiellaburnetii</i> oder Phase I IgG Antikörper-Titer > 1:800</p>
<p>Nachweis einer Endokardbeteiligung</p> <p>- Positive Echokardiographie: Vegetationen, Abszesse oder neu aufgetretene Dehiszenzen bei Kunstklappen</p>

- Neu aufgetretene Klappeninsuffizienz

Nebenkriterien

- Prädisposition:** prädisponierende kardiale Grunderkrankungen, intravenöser Drogenabusus
- **Fieber:** Temperatur > 38°C
 - **Vaskuläre Phänomene:** große arterielle Embolien, septische pulmonale Infarkte, mykotische Aneurysmen, intrakranielle Blutungen, konjunktivale Blutungen, Janeway Läsionen
 - **Immunologische Phänomene:** Glomerulonephritis, Osler Knötchen, Roth's Spots, positive Rheumafaktoren
 - **Mikrobiologie:** positive Blutkulturen, welche die Hauptkriterien nicht erfüllen oder serologischer Nachweis einer aktiven Infektion mit einem Erreger der konsistent mit einer IE ist

Diagnose einer definitiven IE bei:
 2 Hauptkriterien, *oder*
 1 Haupt- und 3 Nebenkriterien, *oder*
 5 Nebenkriterien

Diagnose einer möglichen IE bei:
 1 Haupt- und 1 Nebenkriterium, *oder*
 3 Nebenkriterien

Abkürzungen: IE= infektiöse Endokarditis, HACEK= *Haemophilus* Spezies, *Aggregatibacter* Spezies, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenellacorrodens*, *Kingella* Spezies

Echokardiographie

Die echokardiographische Bildgebung ist in der Diagnostik der IE essentiell und sollte bei jedem klinischem Verdacht so schnell wie möglich zum Einsatz kommen. Es gibt die Möglichkeit der Durchführung einer transthorakalen (=TTE) oder einer transösophagealen (=TEE) Echokardiographie. Mit der Ultraschalluntersuchung können Vegetationen (mit Größenbestimmung), Abszesse und Dehiszenzen von Kunstklappen detektiert und beurteilt werden. Darüber hinaus kann der Schweregrad von Klappenvitien bestimmt und intrakardiale Komplikationen aufgedeckt werden. Zusätzlich quantifiziert eine solche Untersuchung die Herzfunktion und detektiert das Risiko für Embolien (80).

Die TTE ist ein nicht-invasives Verfahren und weist eine Sensitivität, abhängig von der Literatur, von 40-75% auf (6,80). Vegetationen unter 5 mm lassen sich lediglich in 25% der Fälle (81) nachweisen, und solche unter 2 mm werden im Rahmen der TTE gar nicht erfasst. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse kann bei schwierigen Untersuchungsbedingungen (durch Vorliegen eines Emphysems oder eines ungünstigen Habitus) herabgesetzt sein. Die TTE ist außerdem nicht ausreichend zur Beurteilung der Funktion von Klappenprothesen geeignet (7).

Die TEE dagegen ist eine invasive, aber sichere Methode mit einer Sensitivität von 85 bis 100% (6,80). Sie sollte bei negativer TTE mit bestehendem klinischem Verdacht auf IE und beizweifelhaften Untersuchungsergebnissen einer TTE durchgeführt werden. Auch bei positiver TTE kann eine TEE durchgeführt werden, um mögliche lokale Komplikationen auszuschließen (55). Die TEE ist die Methode der Wahl zum Nachweis von Vegetationen auf künstlichen Herzklappen oder sonstigen intrakardialen Fremdmaterialien (Herzschrittmacher oder Defibrillator). Ebenfalls dient diese Form der Ultraschalluntersuchung zur Detektion myokardialer Abszesse, sowie zur Diagnose von Klappenperforationen, intrakardialen Fisteln oder Aneurysmen. Sollte der TEE Befund negativ ausfallen, so ist die Diagnose bei bestehendem klinischem Verdacht auf IE trotzdem nicht auszuschließen. In solchen Fällen sollte die TEE im Abstand von fünf bis sieben (55) Tagen wiederholt werden. Von einer Ultraschall-Screening-Untersuchung bei PatientInnen mit einer geringen Erkrankungswahrscheinlichkeit (z.B.: Fieber unklarer Genese) ist abzuraten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Echokardiographie sowohl für die Frühdiagnostik und die Verlaufskontrolle als auch zur Indikationsstellung zur Akutoperation unentbehrlich ist (6,7,17,55).

Blutkulturen

Für die Isolierung und Identifikation von Mikroorganismen, welche eine IE verursachen, ist die Blutkultur von großer Bedeutung und in der Diagnostik nach wie vor ein Grundbaustein. Darüber hinaus ist der Nachweis von Erregern in der Blutkultur für die Resistenzbestimmung und Therapieplanung grundlegend. Nichtsdestotrotz sind Blutkulturen in 2,5 bis 31% (55,82) der Fälle negativ. Daraus ergibt sich die Tatsache, dass die Diagnosestellung wie auch der Beginn einer gezielten antimikrobiellen Therapie verzögert werden und dies zu einem schlechteren Outcome für die Betroffenen führt. Meistens liegt der Grund für negative Blutkulturergebnisse darin, dass PatientInnen vor der Blutabnahme bereits einer Antibiotikatherapie unterzogen wurden oder es sich um einen schwer kultivierbaren Erreger handelt (6,7,55,82).

Deswegen sollten bei Verdacht auf Endokarditis vor Einleitung einer antibiotischen Therapie drei Sets von Blutkulturen (mit je einer aeroben und einer anaeroben Kulturflasche mit jeweils 10 ml Blut pro Flasche) innerhalb der ersten 24 Stunden aus einer neu angestochenen, peripheren Vene abgenommen werden. In einer Studie

aus dem Jahr 2004 wurde gezeigt, dass die Abnahme von drei Blutkultur-Sets etwa 96% aller Bakteriämien detektiert (83). Die Blutabnahme muss nicht zum Zeitpunkt eines Fieberschubs erfolgen sondern kann jederzeit durchgeführt werden (84). Zentrale Venenkatheter und periphere Venenverweilkanülen sollten nicht zur Blutabnahme genutzt werden, da das Risiko einer Kontamination groß ist und Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse entstehen könnten. Findet man innerhalb von 48-72 Stunden keinen Keim, sollten zwei bis drei weitere Blutkulturen abgenommen werden. Zu diesem Zeitpunkt sollte eine Rücksprache mit dem mikrobiologischen Labor erfolgen, um eine Untersuchung unter optimalen Kulturbedingungen zu veranlassen und damit auch schweranzüchtbare Erreger zu erfassen. Wird nach den ersten drei Blutabnahmen ein Keim gefunden, sollte nach 48- 72 Stunden dennoch erneut eine Blutkultur abgenommen werden, um die Effizienz der eingeleiteten Therapie zu beurteilen (7,12,55).

Weitere Untersuchungen

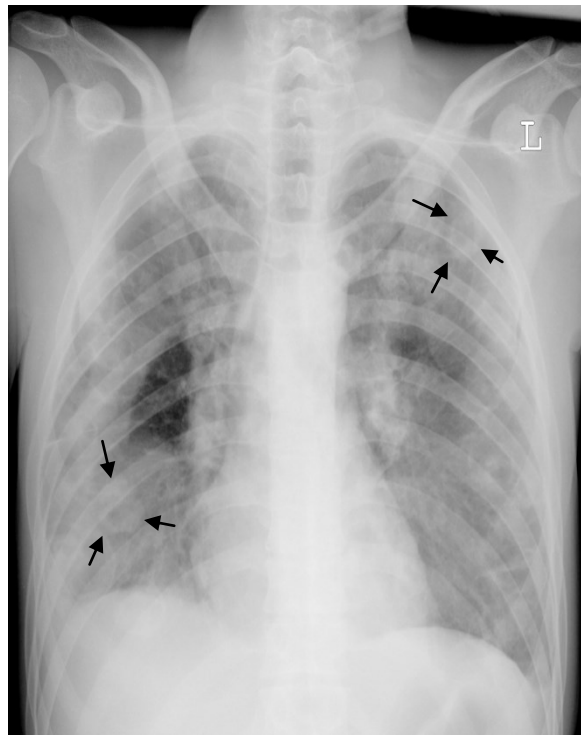
Laborbefunde können durch Erhöhung unspezifischer Parameter auf eine IE hinweisen, und sind somit eine Unterstützung bei der Diagnosefindung. Im Blut zeigen sich erhöhte CRP-Werte, sowie eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit. Des Weiteren besteht oft eine (normozytäre, normochrome) Anämie und eine Leukozytose mit Linksverschiebung. Außerdem werden in vielen Fällen zirkulierende Immunkomplexe und positive Rheumafaktoren im Blut detektiert. Häufig bestehen eine Proteinurie und Mikrohämaturie, sowie ein erhöhtes Serumkreatinin. Die Laboruntersuchungen sind bei der Diagnosestellung zwar entbehrlich, aber für den weiteren Therapieverlauf sind sie von Bedeutung (6,7,47).

Bei Erregern, welche in Blutkulturen schwer kultivierbar sind (*Bartonella* Spezies, Legionellen, *C. burnetii*, *Brucella* Spezies etc.), können serologische Verfahren (indirekte Immunfluoreszenz, ELISA) zum Nachweis von Erreger spezifischen Antikörpern herangezogen werden. Darüber hinaus können Vegetationen nach operativer Entfernung der befallenen Herzklappen mittels Kultur, Histologie und Mikroskopie, Spezialfärbungen (bei *Tropheryma whipplei*) und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (= PCR) von keimspezifischer DNA untersucht werden. Die Untersuchung und Beurteilung von Gewebsmaterial (welches im Rahmen der Operation entnommen wurde) durch den Pathologen ist der Goldstandard zur Diagnosesicherung einer IE. Dabei sollten die Gewebeproben, bevor sie im Labor

untersucht werden, in sterilen Behältern aufbewahrt und weder fixiert noch in ein Kulturmedium eingebettet werden, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden (7,55).

Im Rahmen einer IE kann es zu EKG-Veränderungen (AV-Block, Schenkelblock) kommen, welche auf eine myokardiale oder perivalvuläre Ausbreitung der Infektion hinweisend sein können (85). Im Thoraxröntgen kann bei Entwicklung einer Herzinsuffizienz als Folge der IE eine Zunahme der Herzgröße sichtbar werden. Bei einer Rechtsherzendokarditis können aufgrund septischer Embolien multiple Lungenherde entstehen (47).

Abbildung 2: Lungenherde bei Rechtsherzendokarditis



Andere bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) oder Positronenemissionstomographie (PET) können in der Erkennung und Verlaufskontrolle von Komplikationen einer IE unterstützend sein und wichtige Informationen diesbezüglich liefern. In der Routinediagnostik spielen sie eine eher untergeordnete Rolle (18).

In der Detektion von cerebralen Embolien erweist sich das MRT sensitiver als das CT (55). Embolische Ereignisse im Gehirn treten im Rahmen einer akuten IE in 60-80 % aller Fälle auf (86). In einer Studie mit 130 PatientInnen mit definitiver und möglicher IE zeigte eine MRT-Untersuchung in 82% der Fälle pathologische Befunde, wie zum Beispiel ischämische Läsionen, Mikroblutungen und mykotische Aneurysmen (87). Somit können die Ergebnisse einer MRT-Untersuchung Auswirkungen auf die therapeutischen Strategien, vor allem wenn es um Indikationen für eine Operation oder den Zeitpunkt eines chirurgischen Eingriffs geht oder um die Dauer der antimikrobiellen Therapie, haben (88). Außerdem ist das MRT in der Charakterisierung cerebraler Läsionen bei PatientInnen mit neurologischen Symptomen hilfreich. Eine Studie (87) hat gezeigt, dass bei 25 % der PatientInnen mit nicht gesicherter IE die definitive Diagnose durch eine MRT Untersuchung des Gehirnsfrüher gestellt werden konnte (55).

Das Multislice CT (MSCT) zeigt gute Ergebnisse in der Beurteilung IE-assoziiierter Herzklappenveränderungen, vergleichbar mit der TEE. Vor allem wenn es um die Evaluierung des Ausmaßes von klappenüberschreitenden Ausdehnungen und um die Beurteilung von Abszessen, Fisteln und anatomischen Gegebenheiten von Pseudoaneurysmen geht, zeigt sich das MSCT als gute Untersuchungsmethode (89). Eine Studie, welche im Jahr 2012 veröffentlicht wurde, hat gezeigt, dass das MSCT in der Beurteilung von Dysfunktionen künstlicher Herzklappen, sowie bei der Detektion von Vegetationen, Abszessen, Aneurysmen und Dehiszenzen im Zusammenhang mit künstlichen Herzklappen, mit der TEE gleichzusetzen ist. Das MSCT könnte somit ergänzend in der präoperativen Beurteilung von PatientInnen mit IE bei prothetischer Aortenklappe eingesetzt werden. Jedoch gibt es zu diesem Thema keine großen Vergleichsstudien und daher sollte primär immer eine TEE zur Untersuchung eingesetzt werden (55,90).

Eine Schlüsselrolle spielt das CT bei der präoperativen, nicht-invasiven Beurteilung der Koronararterien und beim Ausschluss einer Arteriosklerose. Dies ist vor allem bei IE-PatientInnen mit großen Vegetationen, welche einen chirurgischen Eingriff benötigen und bei denen im Rahmen einer konventionellen, invasiven Koronarangiographie die Gefahr einer Gefäßwandperforation oder des Abscherens von Vegetationsfragmenten durch den Katheter besteht, von Bedeutung (1,36,91).

1.1.7 Therapie

Antimikrobielle Therapie

Die antimikrobielle Therapie ist eine wesentliche Grundsäule in der Behandlung der IE mit dem Ziel der Eradikation der verursachenden Mikroorganismen. Besonders schwierig ist die Elimination von Bakterien aus den nicht gefäßversorgten, endokarditischen Vegetationen. Erstens sind die Vegetationen für die körpereigene Abwehr schwer erreichbar und zweitens befinden sich die Bakterien dort in einem ruhenden, metabolisch inaktiven Zustand. Hinzu kommt, dass langsam wachsende oder ruhende Bakterien häufig Toleranzen gegenüber Antibiotika entwickeln. Diese Gegebenheiten erklären die Notwendigkeit einer verlängerten Therapiedauer von bis

zu sechs Wochen (55), um alle Bakterien restlos aus den Vegetationen zu beseitigen. In einigen Fällen, zum Beispiel bei Q-Fieber-Endokarditis, dauert die Therapie noch wesentlich länger (92). Prinzipiell ist eine Kombinationstherapie einer Monotherapie vorzuziehen. Dadurch soll die Entwicklung von Resistenzen verhindert/reduziert und der synergistische Effekt von kombinierten Antibiotika gesichert werden (36). Grundsätzlich werden die antiinfektiven Medikamentenparenteral gegeben und müssen hohe Serumspiegel erreichen, um nach Diffusion in die Tiefe ausgedehnter Vegetationen auch dort einen effektiven Wirkspiegel zu gewährleisten. In der antimikrobiellen Therapie der IE werden bakterizide Regime bakteriostatischen vorgezogen, da sich das bakterizide Schema in Studien (93,94) mit Tierversuchen und Menschen als effektiver erwiesen hat (1,5,7,17,36,55).

Unmittelbar nach Abnahme der Blutkulturen kann eine antimikrobielle Therapie in Form einer empirischen Antibiotika-Gabe eingeleitet werden. Wenn aber die PatientInnen klinisch stabil sind, können laut den Guidelines der British Society for Antimicrobial Chemotherapy (95) vor Therapiebeginn die Blutkulturergebnisse abgewartet werden. Nicht selten ist der Einsatz operativer Sanierungsmethoden die einzige Möglichkeit eine vollständige Eradikation der Mikroorganismen zu erreichen. Ist der verursachende Erreger bekannt, ist es bei der Wahl des Antibiotikums wichtig zu wissen, inwieweit der verursachende Erreger auf die Therapie ansprechen wird. Darüber hinaus sollen bei der Wahl des richtigen Medikaments die Begleitdiagnosen und Risikoprofile (Allergien, Simultaninfektionen an anderen Körperstellen, eingeschränkte Organfunktion) der Patientin/des Patienten, sowie das Nebenwirkungsprofil der Medikamente und mögliche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten berücksichtigt werden. Um den PatientInnen die bestmögliche Therapie zu gewährleisten, sollte ein interdisziplinärerer Ansatz gewählt werden, welcher die Zusammenarbeit von Kardiologen/-innen, Infektiologen/-innen, Mikrobiologen/-innen und Herzchirurgen/-innensicherstellt (1,7,12,36).

Empirische Therapie

Die Einleitung einer empirischen, antibiotischen Therapie sollte bei kritisch Kranken so schnell wie möglich erfolgen. Vor Beginn dieser Therapie sollte sichergestellt werden, dass Blutkulturen abgenommen wurden, um die Chancen auf einen

Erregernachweis zu erhöhen und abhängig von den Blutkulturergebnissen eine gezielte und effektive Therapie zu sichern. Bei der Wahl eines adäquaten Therapieschemas ist es wichtig zu wissen, ob die Patientin/der Patient bereits vortherapiert wurde und ob es sich um eine native oder prothetische Herzklappe handelt. Die Therapiedauer der IE bei Klappenprothese sollte mindestens sechs Wochen und bei nativen Klappen zwei bis sechs Wochen betragen (76). Ebenfalls von größter Bedeutung bei der Therapiewahl sind Kenntnisse über die lokale Epidemiologie der IE Erreger hinsichtlich der Antibiotika-Resistenzen. Vor allem aufgrund der regionalen epidemiologischen Unterschiede gibt es in verschiedenen Guidelines unterschiedliche Empfehlungen bezüglich der empirischen Therapie (12,36,55,95).

Jede empirische Therapie sollte die häufigsten drei Erreger der IE (Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken) abdecken. Je nach Risikoprofil der Patientin/des Patienten, zum Beispiel bei PatientInnen mit einer Kunstklappe, welche vor weniger als 12 Monaten eingesetzt wurde und bei healthcare-associated IE, sollte das empirische Therapieschema KNS, MRSA, Enterokokken und non-HACEK gramnegative Pathogene erfassen. Bei mehreren kulturell negativen Episoden muss die Suche nach schwer kultivierbaren Mikroorganismen zum Beispiel durch serologische Verfahren ergänzt werden. Letztendlich erfolgt eine Modifizierung des antimikrobiellen Therapieschemas abhängig von den Kulturergebnissen, der Resistenzentwicklung der Erreger und dem Verlauf der Erkrankung (7,36,55,95).

Eine IE mit Pilzen als verursachende Mikroorganismen bedarf einer antimykotischen Kombinationstherapie und einer chirurgischen Therapie mit Klappenersatz (95,96).

Tabelle 3: Empirische Therapie der IE nach den ESC Guidelines 2015 (aus (55))

Antibiotikum	Dosierung	Kommentar
Community-acquired Nativklappenendokarditis oder Kunstklappenendokarditis (>12 Monate postoperativ)		
Ampicillin <i>plus</i> (Flu)cloxacillin oder Oxacillin	12 g/Tag i.v. in 4-6 Dosen	
<i>plus</i> Gentamicin	12 g/Tag i.v. in 4-6 Dosen	
	3 mg/kg/Tag i.v. oder i.m. in einer Dosis	

Vancomycin <i>plus</i> Gentamicin	30-60 mg/kg/Tag i.v. in 2-3 Dosen 3 mg/kg/Tag i.v. oder i.m. in einer Dosis	Bei PatientInnen mit Penicillin- Allergie
Kunstklappenendokarditis (< 12 Monate postoperativ) oder healthcare-associated IE (nosokomial und nicht-nosokomial erworben)		
Vancomycin <i>plus</i> Gentamicin <i>plus</i> Rifampicin	30-60 mg/kg/Tag i.v. in 2 Dosen 3 mg/Tag i.v. oder i.m. in einer Dosis 900-1200 mg i.v. oder p.o. in 2-3 geteilten Dosen	Rifampicin ist nur bei Kunstklappenendokarditis empfohlen und sollte 3-5 Tage nach Therapiebeginn mit Vancomycin und Gentamicin gegeben werden.

Abkürzungen: i.v.= intravenös, i.m.= intramuskulär, p.o.= per os

Tabelle4: Empirische Therapie der IE laut den Guidelines der Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (aus (95))

Antibiotikum	Dosierung	Kommentar
1. Nativklappenendokarditis- indolente Präsentation		
Amoxicillin <i>plus</i> Gentamicin	2 g alle 4 Stunden i.v. 1 mg/kg (nach aktuellem KG)	Bei stabilen PatientInnen sollten idealerweise die Blutkulturergebnisse abgewartet werden.
2. Nativklappenendokarditis- schwere Sepsis (und keine Risikofaktoren für Enterobakterien und <i>Pseudomonas</i>)		
Vancomycin <i>plus</i> Gentamicin	Dosierung nach den lokalen Leitlinien 1 mg/kg (nach idealem KG) alle 12 Stunden i.v.	Bei PatientInnen mit Penicillin- Allergie Bei PatientInnen mit Vancomycin- Allergie Daptomycin (6 mg/kg i.v. alle 24 Stunden) verwenden.
3. Nativklappenendokarditis- schwere Sepsis und Risikofaktoren für multiresistente Enterobakterien und <i>Pseudomonas</i>		
Vancomycin <i>plus</i> Meropenem	Dosierung nach den lokalen Leitlinien, i.v.- Gabe 2 g alle 2 Stunden i.v.	
4. Kunstklappenendokarditis bei fehlenden Blutkulturergebnissen oder bei negativen Blutkulturen		
Vancomycin <i>plus</i> Gentamicin <i>plus</i> Rifampicin	1g alle 12 Stunden i.v. 1 mg/kg alle 12 Stunden i.v. 300-600 mg alle 12 Stunden i.v. oder p.o.	Bei schwerer Nierenschädigung niedrigere Dosen von Rifampicin verwenden.

Abkürzungen: i.v.=intravenös, i.m.= intramuskulär, p.o.= per os

Chirurgische Therapie

Etwa 50% (51) der PatientInnen mit IE benötigen einen chirurgischen Eingriff im Verlauf ihrer Erkrankung. Der Grund dafür sind schwere Komplikationen, wie Herzinsuffizienz durch Klappendysfunktion, welche im Rahmen einer IE entstehen können. Die Ziele einer operativen Intervention sind die Sanierung der Infektion durch vollständige Entfernung des infizierten Gewebes und die Rekonstruktion der normalen Anatomie des Herzens. Eine Klappenrekonstruktion, falls möglich, ist einem Klappenersatz vorzuziehen. Dies gilt vor allem für die Mitralklappen- oder Trikuspidalklappen (97). Sollte eine künstliche Herzklappe benötigt werden, wird in den Guidelines (55) bewusst keine Empfehlung für die Verwendung einer biologischen oder einer mechanischen Herzklappe ausgesprochen, da die Wahl des Operationsverfahrens und der Prothese von der Situation des Patienten abhängig ist (1,55,98).

Da der geeignete Operationszeitpunkt generell schwierig festzulegen ist und individuell von Fall zu Fall bestimmt werden muss, ist die frühzeitige Einbeziehung eines Herzchirurgen/ einer Herzchirurgin in das betreuende Team von großer Bedeutung (55). Gründe für die Erwägung einer frühzeitigen Operation, während der aktiven Phase der IE, in welcher die PatientInnen eine medikamentöse Therapie bekommen, sind das Verhindern der Progression einer Herzinsuffizienz und die Prävention systemischer Embolien (99–101). Andererseits wurde in einer Studie (99) gezeigt, dass operative Eingriffe, welche innerhalb der ersten Woche nach Diagnosestellung durchgeführt wurden, auch einige Risiken, wie Rezidive und postoperative Klappendysfunktion, mit sich bringen. Eine andere Studie (102) verglich die Ergebnisse nach einem frühzeitigen operativen Eingriff (innerhalb von 48 Stunden) mit denen nach konventioneller Therapie (einschließlich Operation) bei relativ jungen Männern (Durchschnittsalter von 47 Jahren) mit großen Vegetationen und wenig Komorbiditäten. Jene Gruppe, welche einer frühzeitigen Operation unterzogen wurde, zeigte eine signifikant niedrigere Mortalität im Krankenhaus und weniger embolische Ereignisse. Vor allem PatientInnen mit einem hohen Risiko für Embolien scheinen von einer früh angesetzten Operation zu profitieren. Das Patientenkollektiv aus dieser Studie ist jedoch ein selektives und repräsentiert nur einen kleinen Teil der IE-PatientInnen, weshalb es schwierig ist, aufgrund der Ergebnisse dieser Studie allgemein gültige Schlussfolgerungen zu ziehen. Ob und

inwieweit eine Patientin/ ein Patient von einem (frühzeitigen) operativen Eingriff profitiert, hängt von vielen Faktoren, wie zum Beispiel den Komorbiditäten der Betroffenen und den Komplikationen, ab (55,100). Das Alter alleine ist keine Kontraindikation für eine Operation (103).

Die Indikationen mit Dringlichkeitsstufe für eine Operation sind in Tabelle 5 aufgelistet. Bezogen auf die Dringlichkeit einer chirurgischen Intervention gibt es Notfallindikationen, welche innerhalb von 24 Stunden operiert werden müssen und dringende Indikationen, die innerhalb einer Woche operiert werden müssen. In beiden Fällen ist der Operationszeitpunkt unabhängig von der Dauer der antibiotischen Therapie. Daneben gibt es elektive Indikationen, welche erst nach ein- bis zweiwöchiger Antibiotika-Gabe unter klinischer und echokardiographischer Observation, operiert werden müssen (98,104).

Prinzipiell gibt es drei Indikationen für eine Operation: Herzinsuffizienz, unkontrollierbare Infektion und Prävention von Embolien (36).

Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz (HI) stellt die häufigste Komplikation einer IE dar und ist somit auch die häufigste Indikation für eine kardiochirurgische Intervention (51). Hervorgerufen wird die HI durch eine neu aufgetretene oder sich verschlechternde Klappendysfunktion, welche sich entweder in Form einer Insuffizienz der Aorten- oder Mitralklappe oder, seltener, in Form einer Klappenobstruktion bei großen Vegetationen präsentiert (7,55). Eine intrakardiale Fistelbildung kann ebenfalls zur Entstehung einer HI führen, wobei sie bei einer IE der Klappenprothesen häufiger auftritt (105). Die klinische Präsentation der HI geht von Dyspnoe, über Lungenödem bis hin zum kardiogenen Schock (106,107). Laut einer Studie aus dem Jahr 2011 mit 4075 PatientInnen mit IE und schwerer HI als Komplikation befanden sich 66 % von ihnen in Stadium III oder IV der New York Heart Association-Klassifikation (108). In der initialen Einschätzung der HI und den Nachfolgeuntersuchungen sowie in der Beurteilung der hämodynamischen Konsequenzen einer Herzklappendysfunktion und der systolischen Linksventrikelfunktion ist die Echokardiographie unentbehrlich (109,110). In den meisten Fällen ist eine HI im Rahmen einer IE eine Notfallindikation für eine Operation (99,111). Schwere Aorten- und

Mitralklappeninsuffizienz, intrakardiale Fistelbildung und Klappenobstruktion durch Vegetationen als Auslöser einer HI, wären Indikationen für eine Notfalloperation. Auch eine schwere, akute Aorten- oder Mitralklappeninsuffizienz ohne klinische Präsentation, aber mit echokardiographischen Zeichen, wie erhöhtem linksventrikulären enddiastolischen Druck, erhöhtem linksatrialen Druck oder moderater bis schwerer pulmonaler Hypertension, wäre eine Indikation zu einer sofortigen Operation (55). Das Auftreten persistierender Lungenödeme oder eines kardiogenen Schocks trotz medikamentöser Therapie bedürfen ebenfalls einer kardiochirurgischen Intervention innerhalb von 24 Stunden (112). Die aufgelisteten Indikationen gelten für die IE bei nativen als auch bei künstlichen Herzklappen (113,114).

Komplexe Infektion

Unbeherrschbare oder komplexe Infektionen sind gefürchtete Komplikationen einer IE und die zweithäufigste Ursache für die Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs (51). Die häufigste Ursache für die Entwicklung einer unkontrollierbaren Infektion ist die Ausdehnung der Entzündung über den Herzklappenring hinaus. Abszesse, Pseudoaneurysmen, Fistelbildung und ein neu aufgetretener AV-Block können die Folgen einer perivalvulären Infektion sein (36,115,116). Anhaltendes Fieber trotz angemessener Therapie, neu aufgetretene EKG-Veränderungen oder eine Perikarditis können einen Hinweis auf ein solches Geschehen liefern. Prinzipiell kann die Entzündungsausbreitung von jeder Klappe ausgehen, wird aber am häufigsten im Bereich der Aortenklappe beobachtet (7). In Studien (117,118) wird beschrieben, dass das Vorhandensein einer Klappenprothese, die Aortenklappe als Lokalisation und eine Infektion mit KNS die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung perivalvulärer Komplikationen sind. Pseudoaneurysmen und Fisteln als schwerwiegende Komplikationen einer Entzündungsausbreitung führen oft zu einer enormen Schädigung valvulärer und perivalvulärer Strukturen (119,120). Eine Fistelbildung ist am häufigsten mit einer Staphylokokken-bedingten-IE assoziiert und führt sogar unter chirurgischer Therapie in etwa 40% der Fälle zum Tod (120). Zur Detektion einer perivalvulären Entzündungsausbreitung wird am häufigsten eine TEE verwendet, wobei kleinere Abszesse in der Nähe eines verkalkten Mitralklappenrings häufig übersehen werden (7,55,121). Obwohl perivalvuläre Infektionen in manchen Fällen auch konservativ behandelt werden können, ist immer

dann eine kardiochirurgischer Eingriff indiziert, wenn Fieber persistiert, Fistelbildung auftritt, Klappenprothesen sich ablösen oder es zu einer Verschlechterung der Infektion unter adäquater medikamentöser Therapie kommt (7). Bei Persistieren der Infektion über sieben bis zehn Tage mit anhaltend positiven Blutkulturen und nicht anderweitig erklärbarem Fieber (bei IE mit positiver oder negativer Blutkultur) trotz eines optimal angepassten Therapieschemas, ist ebenfalls eine chirurgische Intervention indiziert (7,55). Laut einer Studie aus dem Jahr 2012 ist dieser Zeitraum von sieben bis zehn Tagen zu lange angesetzt. Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass das Persistieren positiver Blutkulturen über 48-72 Stunden nach Beginn einer Antibiotikatherapie ein unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität im Krankenhaus ist und deswegen eine Operation bereits nach 3 Tagen in Betracht gezogen werden sollte (122).

Bei einem Nachweis von aggressiven Erregern, welche einer antimikrobiellen Therapie schlecht zugänglich sind, ist ebenfalls eine Operation begründet. Solche Erreger wären gramnegative Bakterien, MRSA, *S. lugdunensis*, Vancomycin-resistente Enterokokken, *Brucella spp.*, *C. burnetii* und Pilze (7,54,122,123). Bei einer IE künstlicher Herzklappen sollte bei Erregernachweis von non-HACEK gramnegativen Bakterien und Staphylokokken eine chirurgische Intervention gedacht werden. Eine IE der nativen Aorten- oder Mitralklappe stellt bei einer Infektion mit *S. aureus*, sollte sich eine Antibiotikatherapie in den ersten paar Tagen nicht als erfolgreich erweisen, eine Indikation für eine Operation dar (55,125,126). Eine isolierte Trikuspidalklappenendokarditis mit *S. aureus* wird auch bei anhaltendem Fieber nur selten operiert (7).

Prävention von Embolien

Die dritte Indikation für einen chirurgischen Eingriff dient der Prävention von Embolien. Diese sind durch Verschleppung von Vegetationsfragmenten bedingt und können im schlimmsten Fall zu Infarkten im betroffenen Endorgan führen (7). Embolische Ereignisse sind häufig und kommen bei 25-50% (10) aller IE-PatientInnen vor. Bei einer IE des linken Herzens finden sich Embolien am häufigsten im Gehirn und in der Milz, wenn auch die Gefäße jedes anderen Organs betroffen sein können (36,55). Ein cerebraler Insult stellt eine schwerwiegende Komplikation dar und ist mit einer erhöhten Mortalitäts- und Morbiditätsrate vergesellschaftet (127). Ist das rechte Herz betroffen, können Lungenembolien, oder

bei einem offenen Foramen ovale, Embolien im systemischen Kreislauf auftreten (36). Zusätzlich kann es im Rahmen von Embolien durch Vegetationsfragmente zur sekundären Infektion in der Gefäßwand kommen und als Folge daraus zur Ausbildung eines mykotischen Aneurysmas. Solche Aneurysmen werden am häufigsten in cerebralen Gefäßen beobachtet. Sie sind zwar selten, aber können schwere Komplikationen mit sich bringen. In den meisten Fällen bleiben sie jedoch klinisch unauffällig (128,129). Das Risiko für Embolien ist in den ersten zwei Wochen, besonders in den ersten Tagen nach Diagnosestellung und Einleitung der antibiotischen Therapie, am größten und nimmt danach deutlich ab (130–132). Die echokardiographische Untersuchung mittels TEE (109) spielt eine Schlüsselrolle in der Bestimmung von Größe und Lage der Vegetation und kann dazu beitragen das Risiko für embolische Ereignisse abzuschätzen, wobei eine genaue Vorhersage für die einzelne Patientin/ den einzelnen Patienten schwierig ist (7,131,133). Bestimmte Faktoren wie zum Beispiel Größe, Beweglichkeit und Lokalisation der Vegetation, vorausgegangene Embolien und bestimmte Erreger (*S. aureus*, *S. bovis* (134), *Candida spp.*) sind mit einer erhöhten Embolisierungsrate assoziiert. So kommt es häufiger zu Embolien, wenn Vegetationen größer sind (>10 mm Länge), eine hohe Beweglichkeit aufweisen oder auf der Mitralklappe lokalisiert sind (109,131,135,136). Indikationen für einen operativen Eingriff zur Prävention embolischer Ereignisse sind große (>10 mm), persistierende Vegetationen und rezidivierende Embolien. Eine chirurgische Intervention sollte in den frühen Tagen nach Einleitung der antibiotischen Therapie erfolgen, da hier das Risiko einer Embolisierung am größten ist (10,131).

Tabelle 5: Indikationen für einen operativen Eingriff mit Dringlichkeitsstufe (aus (55))

Indications for surgery	Timing ^a
1. Heart failure	
Aortic or mitral NVE or PVE with severe acute regurgitation, obstruction or fistula causing refractory pulmonary oedema or cardiogenic shock	Emergency
Aortic or mitral NVE or PVE with severe regurgitation or obstruction causing symptoms of HF or echocardiographic signs of poor haemodynamic tolerance	Urgent
2. Uncontrolled infection	
Locally uncontrolled infection (abscess, false aneurysm, fistula, enlarging vegetation)	Urgent
Infection caused by fungi or multiresistant organisms	Urgent/ elective
Persisting positive blood cultures despite appropriate antibiotic therapy and adequate control of septic metastatic foci	Urgent
PVE caused by staphylococci or non-HACEK gram-negative bacteria	Urgent/ elective
3. Prevention of embolism	
Aortic or mitral NVE or PVE with persistent vegetations > 10 mm after one or more embolic episode despite appropriate antibiotic therapy	Urgent
Aortic or mitral NVE with vegetations > 10 mm, associated with severe valve stenosis or regurgitation, and low operative risk	Urgent
Aortic or mitral NVE or PVE with isolated very large vegetations (> 30 mm)	Urgent
Aortic or mitral NVE or PVE with isolated large vegetations (> 15 mm) and no other indication for surgery ^e	Urgent

Abkürzungen: NVE= Native valveendocarditis, PVE= Prostheticvalveendocarditis, HF= Heart failure, HACEK: *Haemophilus* Spezies, *Aggregatibacter* Spezies, *Cardiobacteriumhominis*, *Eikenellacorrodens*, *Kingella* Spezies

Präoperatives und perioperatives Management

Vor der Operation wird eine Koronarangiographie bei Männern über 40 Jahren, bei postmenopausalen Frauen und bei PatientInnen mit mindestens einem kardiovaskulären Risikofaktor oder einer bekannten koronaren Herzerkrankung empfohlen. Ausnahmen von diesen Empfehlungen können bei sehr großenaortalen Vegetationen wegen der Gefahr eines Abscherens durch den Katheter sowie in Notfallsituationen gemacht werden. In solchen Situationen können hochauflösende Schichtbildverfahren das Bestehen einer relevanten koronaren Herzerkrankung bei hämodynamisch stabilen PatientInnen ausschließen (137).

Beim Vorliegen extrakardialer infektiöser Foci, sollten diese nach Möglichkeit vor einem herzchirurgischen Eingriff und vor Beendigung der antibiotischen Therapie saniert werden (1,55).

Die Verwendung einer intraoperativen TEE dient der Bestimmung der genauen Lokalisation und des Ausmaßes der Infektion sowie zur Beurteilung des operativen Ergebnisses. Außerdem wird die TEE zur Durchführung postoperativer Nachfolgeuntersuchungen verwendet (138).

1.1.8 Prophylaxe/Prävention

Das Ziel einer prophylaktischen Antibiotikagabe bei PatientInnen mit einer Prädisposition für die Entwicklung einer IE, ist die Reduktion der Häufigkeit von Bakteriämien und das Verhindern der Anlagerung von Bakterien am Endokard während transienter Bakteriämien, welche im Rahmen invasiver medizinischer (meist zahnärztlicher) Eingriffe, aber auch bei alltäglichen Verrichtungen wie dem Zähneputzen entstehen können (36,55). Viele Studien haben aber nur eine geringe Effizienz einer prophylaktischen Antibiotika-Gabe gezeigt (29,139,140). Ein Grund dafür ist, dass die meisten IE-Fälle nicht nach einem medizinischen (zahnärztlichen) Eingriff auftreten und etwa 35% der Fälle von einem Erreger verursacht werden, welcher durch die gängige Antibiotikaprophylaxegar nicht erfasst wird (7). Bezüglich dentaler Prozeduren zeigt die Häufigkeit und Größenordnung von Bakteriämien keinen wesentlichen Unterschied zwischen zahnärztlichen Eingriffen und Alltagsaktivitäten wie Zähneputzen oder dem Gebrauch von Zahnseide. Da zahnärztliche Eingriffe nicht allzu häufig vorkommen, ist die Exposition von Endokarditis-empfindlichen kardialen Strukturen durch Bakteriämien mit Mikroorganismen der Mundflora häufiger durch die oben genannten Alltagsaktivitäten verursacht, als durch eine Behandlung beim Zahnarzt (7,36). Eine Studie aus dem Jahr 2009 hat gezeigt, dass mangelhafte Mundhygiene und Zahnfleischbluten nach dem Zähneputzen Risikofaktoren für die Entstehung von Bakteriämien sind (141). Die Erhaltung einer guten Mundhygiene ist somit eine ausgezeichnete Maßnahme in der Prävention der IE (142). Weitere präventive Hygienemaßnahmen wären zum Beispiel Hauptpflege, Desinfektion von Wunden, kurative Antibiotika-Therapien bei Infekten und regelmäßige Kontrollen beim Zahnarzt (55,143).

Im Jahr 2002 wurde laut den Empfehlungen aus Frankreich eine Restriktion der Indikationen für eine antibiotische Prophylaxe bei RisikopatientInnen eingeleitet

(143). Dieser Trend in Richtung Reduktion oder sogar Weglassen einer prophylaktischen Antibiotikagabe setzte sich in den darauffolgenden Jahren fort (142). Das britische National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) rät zum Beispiel unabhängig vom Risiko der PatientInnen von einer antibiotischen Prophylaxe bei zahnärztlichen sowie bei allen anderen invasiven Prozeduren ab. Gründe dafür sind das Fehlen einer starken Evidenzbasis, die niedrige Rate an IE, welche durch zahnärztliche Prozeduren hervorgerufen wird und mögliche Nebenwirkungen einer Antibiotikatherapie (144). Die Richtlinie für IE der ESC aus dem Jahr 2015 empfiehlt eine antibiotische Prophylaxe nur noch bei PatientInnen, welche das höchste Risiko für die Entwicklung einer IE aufweisen. Zu diesen gehören PatientInnen mit einer prothetischen Herzklappe, bereits durchgemachter IE und solche mit einem angeborenen zyanotischen Herzfehler oder einem anderen, mit Fremdmaterial korrigierten, kongenitalen Herzfehler. Eine Prophylaxe wird für Behandlungen am Zahnfleisch, der periapikalen Zahnregion und bei submukosalen Eingriffen im Mund empfohlen. Eine Bronchoskopie, Laryngoskopie, transnasale oder endotracheale Intubation, Gastroskopie, Coloskopie, Cystoskopie, vaginale Geburt oder Sectio, eine TEE und Eingriffe, welche die Haut oder Weichteile betreffen, verlangen keine antibiotische Prophylaxe (55,145).

Bei PatientInnen, welche sich der Implantation eines Herzschrittmachers oder eines Kardioverter-Defibrillators unterziehen, reduziert die prophylaktische Gabe von Antibiotika vor der Implantation das Risiko einer nachfolgenden Infektion (146).

Als Präventionsmaßnahme zur Verhinderung oder Minimalisierung katheterassoziierter Bakteriämien dient die Anwendung aseptischer Techniken und die richtige Pflege im Umgang mit zentralen Venenkathetern sowie das frühzeitige Entfernen dieser (22).

Tabelle 6:Antibiotikaprohylaxe der ESCGuidelines für IE (aus (55))

Besonderheiten	Antibiotikum	Erwachsene*	Kinder**
Keine Allergie auf Penicillin oder Ampicillin	Amoxicillin <i>oder</i> Ampicillin	2 g p.o. oder i.v	50 mg/kg p.o. oder i.v.
Allergie auf Penicillin oder Ampicillin	Clindamycin	600 mg p.o. oder i.v.	20 mg/kg p.o. oder i.v.

*, ** Das Antibiotikum wird einmalig (gesamte Dosis) 30-60 Minuten vor dem Eingriff verabreicht.
Abkürzungen: i.v.= intravenös, p.o.= per os

1.2. Molekularbiologische Techniken in der Diagnostik der IE

1.2.1. Einleitung

Die IE wird anhand klinischer, echokardiographischer und mikrobiologischer Parameter gemäß der modifizierten Duke-Kriterien (79) diagnostiziert. Die konventionellen mikrobiologischen Diagnostikmethoden der IE beruhen hauptsächlich auf dem Nachweis von Erregern mittels Kultur. Oft bleiben aber die Blut- oder Klappenkulturen aufgrund einer vorausgegangenen Antibiotika-Therapie oder beim Vorliegen von langsam wachsenden, intrazellulären und schlecht kultivierbaren Keimen negativ. Zur Überbrückung dieser Einschränkungen wurden zur Detektion und Identifizierung der verursachenden Erreger molekularbiologische Nachweisverfahren für Diagnostik der IE erprobt. Im Gegensatz zu den konventionellen mikrobiologischen Nachweismethoden sind die modernen molekularen Techniken kulturunabhängig und basieren zum Beispiel auf der Vervielfältigung von Nukleinsäuren der Mikroorganismen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und nachfolgender Sequenzierung des Amplifikats (147,148). In weiterer Folge wird eine Genanalyse und der Abgleich der Ergebnisse mit Datenbanken durchgeführt (149).

Die PCR beruht auf dem Prinzip der exponentiellen, enzymatischen Vermehrung eines genau definierten Abschnittes der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und ist die

am häufigsten verwendete Technik unter den Amplifizierungsmethoden. Dabei dienen jeweils die Reaktionsprodukte eines Zyklus als Matrize für die Vermehrung im nächsten Zyklus. Durch die starke Vermehrung bestimmter Nukleinsäuresequenzen lassen sich diese leichter nachweisen. Für die PCR werden zwei Primer, eine hitzestabile DNA-Polymerase und Nukleotidtriphosphate benötigt (148,150,151). Eine große technische Schwierigkeit stellt die Kontamination der PCR durch nachzuweisende DNA dar, die nicht von der Patientin/ vom Patienten stammt, sondern aus anderen Proben (Kreuzkontamination) oder der vorherigen PCR (Produktkontamination). Zum Nachweis der Nukleinsäure nach der Amplifikation muss diese durch Gelelektrophorese und Anfärben mit einem Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht werden. Als Sequenzierung bezeichnet man das Ermitteln der Abfolge der Basen in einem DNA-Amplifikat nach der Durchführung der PCR (150).

Viele Studien belegen in Bezug auf die Erregerdiagnostik mittels PCR und Sequenzierung eine hohe Sensitivität dieser Techniken und somit eine potentielle Verbesserung im Management der IE-PatientInnen (147,152,153). Daraus profitieren vor allem PatientInnen mit kulturnegativer IE, besonders wenn diese durch eine vorausgegangene Antibiotikatherapie bedingt ist (149,154). Aber auch in Fällen mit positiven Blutkulturen und anderen zweifelhaften/ungewissen IE-Fällen ist diese Methode in der Identifizierung der verursachenden Mikroorganismen nützlich und somit ein ergänzendes Werkzeug in der Diagnostik dieser Erkrankung (148). Die Extraktion der eubakteriellen DNA zur Vervielfältigung erfolgt aus dem im Rahmen einer Operation entnommenen Herzklappengewebe oder aus dem Blut (153,155) der Patientin/des Patienten. Die Identifizierung der Erreger aus den entnommenen Herzklappen basierend auf PCR-Techniken ist eine sehr sensitive Methode und kann in vielen unklaren IE-Fällen Aufschluss bezüglich der Ätiologie geben (152,156). Bezüglich der Erregeridentifizierung aus dem Blut der PatientInnen mittels molekularer Techniken berichtet eine Studie aus dem Jahr 2003. Dabei erfolgte die Identifizierung der Mikroorganismen aus Blutproben der PatientInnen mittels Septi Fast-Test. Bei diesem Test handelt es sich um ein Breitspektrum ("broad-range"), Echtzeit ("real-time") PCR-Testverfahren. Die Aufdeckung der Mikroorganismen war vor allem bei negativen Blutkulturen aufgrund einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie erfolgreich. Für kulturpositive Blutproben zeigte sich dieser Test weniger sensitiv als konventionelle mikrobiologische Methoden. Ein weiterer

Nachteil war, dass dieses Testverfahren nicht die Gruppe der HACEK-Keime beinhaltet (155).

Obwohl molekulare Techniken kulturunabhängig sind und somit in der Diagnostik der IE von großem Nutzen sein können, dürfen die Nachteile dieser Methoden nicht außer Acht gelassen werden. Erhebliche Einschränkungen ergeben sich aufgrund von möglichen falsch positiven Ergebnissen bei Kontamination des verwendeten Materials oder aufgrund von falsch negativen Befunden. Einen kritischen Schritt, durch welchen es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann, stellt die Extraktion der DNA dar. Wie effizient diese Extraktion durchgeführt wird, hängt von der verwendeten Extraktions-Technik, der Beschaffenheit der bakteriellen Zellwand, der Menge an Hintergrund DNA oder eukaryotischer DNA der Patientin/des Patienten, der Größe und Menge des zu amplifizierenden Fragments und vom Vorhandensein von Inhibitoren ab. Auf der anderen Seite sind Amplifizierungstechniken sehr anfällig für Kontamination. Verunreinigungen können durch die allgegenwärtige Präsenz von kontaminierter bakterieller DNA entstehen, welche nicht nur in Gewebs- oder Blutproben zu finden ist, sondern auch in den verwendeten Reagenzien, Röhren oder auf Pipettenspitzen (148,149,157).

1.2.2. 16S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA)- Sequenzierung

Die 16S rRNA ist die molekulare Hauptkomponente der kleineren Untereinheit prokaryotischer Ribosomen (158). Das Gen für die Kodierung der 16S rRNA befindet sich auf der ribosomalen DNA (16S rDNA) und besteht aus etwa 1550 Basenpaaren (159). Dieser Bereich des bakteriellen Genoms beinhaltet sowohl hoch konservierte, bei fast allen Bakterien identische, Sequenzen wie auch variable Bereiche, die jeweils für eine bestimmte Gruppe von Bakterien (z.B. eine Spezies) charakteristisch sind (151,160). Da das 16S rRNA Gen in allen Bakterien präsent ist, erlaubt die Sequenzierung des 16S-rDNA-Bereiches eine Identifizierung und Typisierung (Klassifikation) von vielen Bakterien. Sequenziert werden PCR Produkte. Dazu docken PCR-Primer an hoch konservierte Bereiche der rDNA an und amplifizieren verschiedene Sequenzen des 16S rRNA Gens (161). Für die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten stehen unterschiedliche Primer zur Verfügung (universelle und spezifische Primer) (162,163). Nach der Ermittlung der

Nukleotidabfolgen ist ein Abgleich der Ergebnisse mit Datenbanken möglich, in denen eine große Anzahl an Sequenzen hinterlegt ist. Das 16S rRNA Gen ist das bakterielle Gen mit den meisten, in einer öffentlichen Datenbank abrufbaren, Sequenzen (148,151,159,164). Die Ergebnisse einiger Studien haben ergeben, dass die 16S rRNA Sequenzierung bei der Identifizierung der Bakterien-Gattung in den meisten Fällen (>90%) erfolgreich war. Die Bestimmung der Bakterienspezies gelang in 65-83% und in 1-14% der Fälle blieben die Pathogene unentdeckt (165–167). Probleme bei der genauen Identifizierung von Mikroorganismen mittels 16S rRNA Sequenzierung ergeben sich aus folgenden Gründen: ungenaue oder zu wenig hinterlegte Sequenzen in Datenbanken, manche Spezies weisen ähnliche oder identische Nukleotidabfolgen auf (164). Die Resultate einer Studie, welche im Jahr 2012 veröffentlicht wurde, zeigen, dass die Sensitivität der Keimidentifizierung mittels PCR mit nachfolgender 16S rRNA Sequenzierung von der Größe des zu sequenzierenden Genfragments beeinflusst wird. In dieser Studie wurde die DNA aus Pleuraflüssigkeit, einem Leberabszess und aus Eiter extrahiert (160).

Die 16S rRNA Sequenzierung ist eine nützliche Untersuchungsmethode bei der Detektion und Identifizierung von selten isolierten oder nicht ausreichend beschriebenen Bakterien. Außerdem zeigt sie sich als erfolgreich in der Aufdeckung von Mykobakterien, nicht oder schwer kultivierbaren Mikroorganismen sowie in der Detektion von Erregern, welche selten mit Infektionskrankheiten des Menschen assoziiert sind (159,164).

Bei der Keimidentifizierung aus entnommenem Herzklappengewebe besteht die Gefahr einer Kontamination während der Fixation und Einbettung des Gewebes. Eine Studie aus dem Jahr 2002 ergab, dass die Durchführung einer PCR mit nachfolgender Sequenzierung erschwert ist, wenn das zu untersuchende Gewebe vorher in Paraffin eingebettet wurde (168). Aus diesen Gründen wurde eine retrospektive Studie durchgeführt, welche die Ergebnisse einer 16S rRNA Sequenzierung als Methode zur Keimidentifizierung aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Herzklappen untersuchte. Im Rahmen dieser Studie wurde die DNA aus Paraffinblöcken extrahiert. Verwendet wurden 30 Paraffinblöcke aus einem Pathologiearchiv, welche zwischen 1994 bis 2005 gesammelt wurden. Es wurden nur Paraffinblöcke von PatientInnen verwendet, bei denen eine histologisch gesicherte IE bestand. Die Erregeridentifizierung war in 70% der Fälle erfolgreich, wenn von neueren Paraffinschnitten (nach 2001) die Rede war. Bei den älteren Paraffinblöcken

betrug die Erfolgsrate 40%. In 75% der Fälle stimmten die Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzierung mit denen aus den Klappenkulturen überein. Obwohl die 16S rRNA Sequenzierung in einer beachtlichen Zahl der Fälle den Erreger richtig identifizieren konnte, sollte diese Methode immer im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Gramfärbung aus den originalen Gewebsschnitten interpretiert werden (169).

Ein weiteres Problem bei der Anwendung molekulargenetischer Nachweismethoden wie PCR oder Sequenzierung ist, dass die bakterielle DNA auch nach einer erfolgreichen Antibiotika-Therapie im Gewebe persistieren kann. Das Vorhandensein der bakteriellen DNA im Gewebe bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass die Bakterien auch lebensfähig sind. Diese Tatsache zeigt, dass die Detektion von bakterieller DNA im Herzklappengewebe von PatientInnen mit durchgemachter IE mit Vorsicht interpretiert werden sollte (170).

1.2.3. Next-Generation Sequencing

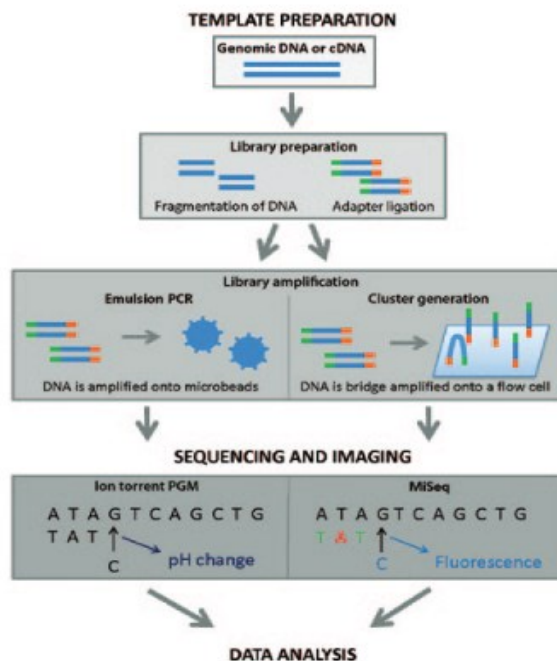
Die Sequenzierung von Nucleinsäuren ist eine Methode zur Ermittlung der exakten Abfolge von Nucleotiden in einem DNA oder RNA Molekül. In den späten 1970er Jahren wurden Methoden von Wissenschaftlern entwickelt, die eine einfache und schnelle Bestimmung der Nucleotidsequenz jedes gereinigten DNA-Fragments erlaubten. Dadurch wurde die Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenzen Hunderttausender Gene und die vollständigen Genomsequenzen vieler Organismen ermöglicht. Ein Beispiel dafür ist das Humangenomprojekt. Nach 13 Jahren voller Bestrebung und Kosten von 3 Milliarden Dollar wurde das menschliche Genom im Jahr 2003 mittels First-Generation-Sequencing (= Sanger-Sequenzierung) vollständig entschlüsselt. Die Sanger-Sequenzierung, welche auch Kettenabbruchmethode genannt wird, wurde 1975 von Edward Sanger erfunden und galt für etwa 25 Jahre als die Goldstandard-Methode für Sequenzierung von Nucleinsäuren. Nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms stieg der Bedarf und die Nachfrage nach kostengünstigeren und schnelleren Sequenzierungstechniken. Dies führte zur Entwicklung der Second-Generation-Sequencing oder auch Next-Generation Sequencing (NGS) genannt. Mit dieser Sequenziertechnik können Hunderttausend bis eine Millionen DNA-Fragmente aus nur einer Vorlage gleichzeitig sequenziert werden. Dieses sogenannte "massive parallele Sequenzieren" (MPS) ermöglicht

einen hohen Durchlauf an Sequenzierungen, wodurch ein gesamtes kleines Genom in weniger als einem Tag sequenziert werden kann (150,171,172). Ein weiterer Vorteil der NGS ist, dass bei jedem Sequenzierschritt das sequenzierte Fragment sichtbar gemacht werden kann. Im Unterschied dazu wird bei der Sanger-Technik jede einzelne DNA-Sequenz mit Didesoxyribonukleotiden angereichert, welche mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert werden. Die Sequenzierung jeder einzelnen solchen DNA-Sequenz wird beendet, bevor die markierten DNA-Fragmente separiert und durch Kapillarelektrophorese sichtbar gemacht werden. Der Nutzen in der Anwendung der NGS ist, dass diese Technik weniger DNA-Vorlagen braucht, schneller arbeitet und kostengünstiger ist (172). NGS findet in vielen Bereichen der Biologie und Medizin Anwendung, sei es in der Forschung oder im klinischen Alltag. Abhängig vom Verwendungszweck können das gesamte Genom, mitochondriale Genome oder bestimmte Gene sequenziert werden.

In den letzten zehn Jahren wurden verschiedene NGS-Plattformen entwickelt. Die zwei am häufigsten verwendeten Geräte der NGS für Forschungszwecke und in klinischen Labors sind "Life Technologies Ion Torrent Personal Genom Machine (PGM)" und "Illumina MiSeq" (171). Zwar weisen die verschiedenen Geräte unterschiedliche Sequenzieretechniken auf, aber der zugrundeliegende Arbeitsablauf ist bei allen Plattformen ähnlich. Die einzelnen Schritte des Arbeitsablaufs sind folgende: Fragmentierung der DNA (die Fragmentlänge beträgt 50 bis 20.000 Basenpaare), Erstellung einer Sequenzier-Bibliothek durch Bindung von Adaptoren (Oligonukleotide) an die Enden der Fragmente, Fixierung der Fragmente über die Adaptersequenz auf einer festen Oberfläche (z.B. Glasplatte), Amplifikation der Fragmente mittels PCR zur besseren Detektion, Sequenzierung, Sichtbarmachen der sequenzierten Fragmente und Datenanalyse (172). Die Technik von Ion Torrent PGM basiert auf einer pH-vermittelten Sequenzierung. Eine DNA-Vorlage wird durch sequentionellen Nukleotideinbau komplementiert. Dabei kommt es durch den Einbau eines Nukleotids zur Ausbildung einer kovalenten Bindung unter Freisetzung eines Pyrophosphats und eines positiv geladenen Wasserstoffions. Der Einbau eines Nukleotids durch eine DNA-Polymerase wird durch die Änderung des pH-Wertes, ausgelöst vom freigesetzten Wasserstoffion, detektiert. Zuvor wird die zu sequenzierende DNA in Mikroreaktionskammern auf einen Halbleiterchip gebracht. Bei der Illumina-sequencing-by-synthesis (SBS) - Methode werden fragmentierte DNA-Vorlagen über spezifische Adaptoren kovalent an einen

Glasobjektträger (FlowCell) gebunden. Hier erfolgt die Sequenzierung zyklusweise und nutzt reversible Terminatorchemie und fluoreszenzmarkierte Nukleotide. Dabei wird in jedem Zyklus genau ein Nukleotid komplementär zur DNA-Vorlage eingebaut. Daraufhin wird die Fluoreszenzgruppe abgespalten, das folgende Lichtsignal detektiert und die Terminatorgruppe entfernt, damit im nächsten Zyklus ein neues Nukleotid eingebaut werden kann (172,173).

Abbildung 3: Grundprinzip der NGS (aus (171))



Limitationen der NGS

Fehler können bei jedem oben genannten Arbeitsschritt auftreten und jede Plattform neigt zu Sequenzierfehlern unterschiedlichen Ausmaßes. Einige Plattformen, darunter auch das Ion Torrent PGM-Gerät, haben zum Beispiel Schwierigkeiten bei der genauen Sequenzierung von Homopolymeren, welche länger als 8 Basenpaare sind. Homopolymere sind Bereiche von sich wiederholenden Nukleotiden. Ein weiterer problematischer Sequenzierbereich für viele Plattformen sind Regionen mit einem hohen oder niedrigen Anteil an Guanin-Cytosin-Basenpaaren (174). Die Fehlerrate der Illumina-Plattform beträgt unter 0.4% und für die Ion Torrent-

Plattform 1,78% (173). Darüber hinaus können Sequenzierfehler durch die Schädigung und/oder Kontamination der DNA-Probe während der Konservierung, zum Beispiel durch die Fixierung des Probematerials mit Formalin, entstehen (175). Auch während der Erstellung einer Sequenzierbibliothek durch Bindung von Plattform-spezifischen Sequenzen an DNA-Fragmente kann es zu Fehlern kommen, welche zu Veränderungen der Sequenzen oder zur Unterbrechung der Sequenz-Tags führen können (176).

Eine weitere Herausforderung beim NGS ist die sinngemäße Handhabung von Millionen bis Milliarden erzeugter Daten. Dafür wurden rechenintensive Bioinformatik-Tools errichtet, welche für die Verwahrung der Daten sorgen, die abgelesenen Daten abgleichen und Kommentare und Vermerke beinhalten. Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Filterung der Daten durch Entsorgung abgelesener Sequenzen mit niedriger Qualität. Dies führt zur Reduktion von großen Datenmengen. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Software-Programme für die Datenanalyse. Falsch positive, wie auch falsch negative Sequenziererergebnisse können zu Fehlern in der Datenabgleichung oder zu einer zu strengen oder zu milden Filterung von Daten führen. Die Datenanalyse kann sehr aufwendig sein und benötigt spezielles Wissen im Bereich der Bioinformatik, um die richtige Information aus den Sequenzier-Daten herauszuholen. Als letztes sei die Kostenfrage erwähnt. Obwohl NGS billiger und zeitsparender als ihre Vorgängermethoden ist, sind NGS-Plattformen für viele Labors nicht leistbar (171,172).

2 Methoden

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde eine retrospektive Datenanalyse von 21 PatientInnen gemacht, bei denen eine Herzklappenoperation durchgeführt wurde. Unter den PatientInnen befanden sich 14 Männer und 7 Frauen im Alter zwischen 22 und 84 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von 61,1 Jahren. Alle PatientInnen wurden im Zeitraum von April 2009 bis November 2014 auf der Klinischen Abteilung für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Graz einem chirurgischen Eingriff unterzogen, bei welchem eine (zwei) Herzklappe/-n entnommen oder rekonstruiert wurde/-n. Das entnommene Herzklappengewebe wurde am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz histologisch untersucht und für den Erregernachweis mittels 16S rRNA Sequenzierung (NGS und Sanger-Methode) verwendet. Das Ziel dieser Arbeit war, die Ergebnisse der routinemäßig durchgeführten Blut- und Klappenkulturen, die Ergebnisse der histologischen Untersuchung und die serologischen Befunde mit den Ergebnissen der 16S rRNA Sequenzierung hinsichtlich des Erregernachweises/-identifizierung zu vergleichen.

Konventionelle mikrobiologische Diagnostikmethoden

Die Blutkulturen (aerob, anaerob) aller PatientInnen wurden für 7 Tage im Blutkulturanalyse Gerät (BACTEC, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) im Mikrobiologischen Labor der Universitätsklinik für Innere Medizin und am Institut für Hygiene der Medizinischen Universität Graz bei 37°C bebrütet. Positive Blutkulturen wurden standardmäßig bearbeitet. Bei zwei Patienten wurde eine serologische Untersuchung zum Nachweis von Erreger-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Ein Teil des entnommenen Herzklappengewebes wurde als natives Material (ohne Formalin-Fixierung) an das Institut für Hygiene geschickt. Dort wurde das Gewebe in ein flüssiges Medium eingelegt und für 5 Tage bebrütet. Das restliche Herzklappengewebe wurde in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mittels histologischer Färbemethoden für die mikroskopische Untersuchung am Institut für Pathologie vorbereitet.

16SrRNAGen PCR und NGS

Am Institut für Pathologie wurde eine Breitspektrum-Identifizierung von Bakterien mittels Amplifikation von eubakterieller DNA unter Anwendung der universellen Primer (Oligonukleotide) 515FPL und 806R durchgeführt. Die bakterielle DNA wurde aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Herzklappengewebe extrahiert. Die Amplifikationsprodukte wurden mit Hilfe des Ion Torrent NGS-Geräts (Thermo Fisher Scientific) sequenziert, wobei die Sequenziertiefe 30.000 Sequenzen im Durchschnitt pro Vorlage betrug. Die Qualitätsprüfung und die Datenanalyse erfolgten mittels Anwendung verschiedener Software-Programme (DeconSeq, Acacia, Usearch und QIIME ((177–180)), welche in der automatisierten 16S rDNA-Analyse-Plattform des NGS-Labors von Professor Gorkiewicz und Professor Kashofer am Institut für Pathologie integriert sind. Um kontaminierte 16S rRNA-Genfragmente aus den verwendeten Materialproben zu identifizieren, wurde für jede Einzelprobe ein Paraffinleerwert ermittelt. Die Sequenzen aus den kontaminierten Fragmenten wurden aus den Sequenz-Daten mit Hilfe bioinformatischer Methoden entfernt.

3 Ergebnisse

In 13 von 21 Fällen (61,9%) stimmte die 16S rRNA Sequenzierung in der Erregeridentifizierung mit den Kulturen (Blut-, Klappen- und/oder Liquorkultur), den Ergebnissen einer serologischen Untersuchung und/oder mit der mikroskopischen Untersuchung des Herzklappengewebes überein. In 9 (Pat.Nr.: 1,2,3,5,8,10,13,14 und 21) von diesen 13 übereinstimmenden Fällen konnte mittels histopathologischer Untersuchung des entnommenen Herzklappengewebes das Vorliegen einer IE gesichert/bestätigt und ein Erreger identifiziert werden. 4 (Pat.Nr.: 6, 9, 15 und 16) der 13 übereinstimmenden Fälle erwiesen sich als Negativkontrolle, da hier nach Entnahme des Herzklappengewebes keine aktive IE mittels histopathologischer Untersuchung nachgewiesen werden konnte. Dementsprechend konnte in diesen Fällen mit Hilfe von Blut- und Klappenkulturen sowie in der mikroskopischen Untersuchung des Gewebes mittels Spezialfärbung kein Erreger nachgewiesen werden. Mittels 16S rRNA Sequenzierung wurden lediglich Kontaminationskeime nachgewiesen.

6 von 21 Fällen (28,6 %) wurden bei der retrospektiven Analyse der Daten als unklar eingestuft. Bei 4 davon konnte die Diagnose einer IE mittels histopathologischer Untersuchungen nicht sicher gestellt werden. In 2 (Pat. Nr.: 11 und 12) von diesen 4 Fällen blieben die Blut- und Klappenkulturergebnisse, die Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzierung sowie die mikroskopische Untersuchung des entnommenen Herzklappengewebes negativ. In den anderen 2 Fällen (Pat.Nr.:4 und 19) wurden mittels Sequenzierung jeweils ein *S. sanguinis* und ein *S.salivarius/ termophilus* detektiert. Die Blutkulturen zeigten in diesen 2 Fällen kein Erregerwachstum. In den Klappenkulturen wurde nur in einem Fall (Pat.Nr.: 4) ein Erreger (*Propionibacterium acnes*) nachgewiesen. In den letzten 2 der 6 unklaren Fälle konnte histopathologisch zwar das Vorliegen einer IE gesichert, aber mittels Blut- und Klappenkulturen sowie mit Hilfe der 16S rRNA Sequenzierung kein Erreger bzw. nur Kontaminationskeime nachgewiesen werden. Bei Patientin Nummer 7 wurden Umweltisolate mit einem 17%-igen Anteil an *E.coli* identifiziert. Patientin wurde vor Abnahme der Blutkulturen für einige Tage einer Antibiotikatherapie unterzogen. Bei der letzten Patientin (Nr.: 17) aus den 6 unklaren Fällen konnte in vorherige Daten nicht eingesehen werden, da sie aus einem Krankenhaus außerhalb

der Steiermark ins Universitätsklinikum Graz überwiesen wurde. Die Blut- und Klappenkulturen, welche am Universitätsklinikum in Graz durchgeführt wurden, konnten keinen Erreger nachweisen, obwohl mittels histologischer Untersuchung das Vorliegen grampositiver Kokken auf dem entnommenen Herzklappengewebe bestätigt wurde.

In einem Fall (Pat.Nr.: 20) konnte nur mittels 16S rRNA der verursachende Erreger nachgewiesen werden. Die Blut- und Klappenkulturen versagten in diesem Fall in der Keimdetektion. Im histologischen Befund wurde eine neutrophil-granulozytäre Entzündung im Bereich des Nahtmaterials der 2004 eingesetzten Aortenklappenprothese beschrieben.

Bei einem Patienten (Nr.: 18) konnte mittels 16S rRNA Sequenzierung kein Erreger nachgewiesen werden. Aus den Blutkulturen konnte in diesem Fall ein *S.caprae* isoliert werden. Auch histopathologisch konnte eine IE gesichert werden und die mikroskopische Untersuchung detektierte grampositive Kokken auf der entnommenen Aortenklappe.

Tabelle 7: Ergebnisse der unterschiedlichen Diagnostikmethoden

Patient/-in	Herzklappe	16SrRNA-Sequenzierung	Blutkultur	Klappenkultur	Histologie	Beurteilung/ Bemerkung
1 (m,47a)	Aortenklappe (nativ)	<i>Bartonella quintana</i>	negativ	negativ	akute ulzero-polypöse Endokarditis	Übereinstimmung Positive Serologie auf <i>Bartonella henselae</i> → Kreuzreaktion Risikofaktor: i.v.Drogenabusus
2 (m,77a)	Aortenklappe (nativ)	<i>Staphylococcus sp.</i>	Koagulase- negative Staphylokokken	negativ	ulzero-polypöse Endokarditis + grampositive Kokken im Herzklappengewebe nachweisbar	Übereinstimmung Portakath als mögliche Infektionsquelle
3 (w,78a)	Aortenklappe Mitralklappe (nativ)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	negativ	Negativ	Entzündung + Thrombenbildung + myxomatöse Klappenstromadegeneration	Übereinstimmung Patientin wegen ZNS- Symptomatik (ZNS- Emboli als Folge der IE?) ins KH eingewiesen → positive Liquorkulturauf <i>S. agalactiae</i>

4 (m,27a)	Aortenklappe (nativ)	<i>Streptococcus sanguinis</i>	negativ	<i>Propionibacterium acnes</i>	stark verkalkte Semilunarklappe + Neovaskularisation+ postentzündliche Residuen	Unklar AKE aufgrund einer Aortenstenose? Risikofaktor: beherdete Zähne
5 (m,61a)	Aortenklappe (nativ)	<i>Tropheryma whipplei</i>	negativ	Negativ	ulzero-polypöse Endokarditis + grampositive Stäbchen im Herzklappengewebe nachweisbar	Übereinstimmung → positive Serologie auf <i>T. whipplei</i>
6 (m,84a)	Aortenklappe (nativ)	Umweltkeime, Kontamination	negativ	<i>Propioni- bacterium acnes</i>	degenerativ veränderte Klappenanteile + Verkalkung+ kein Nachweis einer Endokarditis	Negativkontrolle (<i>Propionibacterium</i> in 1. Linie Kontamination)
7 (w,31a)	Trikuspidalklappe (nativ)	Umweltkeime (17 % <i>E.coli</i>)	negativ	Negativ	akute, phlegmonöse, teils abszedierende Endokarditis	Unklar Antibiotikagabe einige Tage vor Abnahme der Blutkulturen
8 (m,22a)	Mitralklappe (nativ)	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	negativ	Negativ	akute Mitralklappenendokarditis	Übereinstimmung (mit Histologie)

9 (w, mit 79a verstorben)	Aortenklappe Mitralklappe (nativ)	Umweltkeime, Kontamination	negativ	Negativ	ausgeprägte Verkalkungsherde (Mitralklappe- und Aortenklappe)	Negativkontrolle- Operation wegen Aortenstenose und Mitralklappeninsuffizienz
10 (m,36a)	Aortenklappe Mitralklappe (nativ)	<i>Streptococcus sp.</i> (<i>S. oralis</i> oder <i>S. mitis</i>)	<i>Streptococcus sp.</i> (<i>S. oralis</i>)	Streptokokken der Viridans-Gruppe	floride Endokarditis bakterieller Genese	Übereinstimmung
11 (m,64a)	Aortenklappe (Kunstklappe)	Umweltkeime, Kontamination	negativ	Negativ	Verkalkungen+ Degeneration des Klappenstromas+ teilweise akute, entzündliche Infiltrate einer Endokarditis entsprechend	Unklar
12 (m,74a)	Aortenklappe (Kunstklappe)	Umweltkeime, Kontamination	negativ	Negativ	hochgradig verkalkte Semilunarklappenanteile + fibrinöse Endokarditis	Unklar
13 (w,68a)	Aortenklappe Mitralklappe (nativ)	<i>Streptococcus sp.</i> (<i>S. sanguinis</i>)	<i>Streptococcus sp.</i> (<i>S. mitis</i>)	Negativ	akute ulzero- polypöseMitralklappenendokarditis + grampositive Kokken im Herzklappengewebe nachweisbar	Übereinstimmung
14 (m,55a)	Aortenklappe (Kunstklappe)	<i>Staphylococcus aureus/ warneri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativ	diskrete fokale Entzündung	Übereinstimmung
15 (m,65a)	Aortenklappe (nativ)	Umweltkeime	negativ	Negativ	Aortenklappensklerose	Negativkontrolle Operation aufgrund hochgradiger Aortenstenose

16 (m,59a)	Aortenklappe (nativ)	Umweltkeime	negativ	Negativ	Aortenklappensklerose	Negativkontrolle Operation aufgrund einer Aortenstenose
17 (w,79a)	Mitralklappe (nativ)	Umweltkeime	negativ	Negativ	akute ulzero- polypöseMitralklappenendokard- itis + Mitralklappensklerose + fokale fragliche in Häufchen liegende grampositive Kokken in der Spezialfärbung nachweisbar	Unklar Einsicht in Daten war nicht möglich → Patientin wurde von einem Krankenhaus außerhalb der Steiermark nach Graz überwiesen
18 (m,55a)	Aortenklappe Mitralklappe (nativ)	Kontamination	<i>Staphylococcus caprae</i>	Negativ	akute ulzeröse Endokarditis + grampositive Kokken im Herzklappengewebe nachweisbar	Mittels 16S rRNA- Sequenzierung konnte kein Keim identifiziert/nachgewiesen werden → falsch negative 16S rRNA
19 (m,82a)	Mitralklappe (nativ)	<i>Streptococcus salivarius/ termophilus</i>	negativ	Negativ	fokal chronisch aktive fibrinöse Endokarditis + Herzklappenanteile mit Sklerose	Unklar
20 (w,68a)	Aortenklappe (Kunstklappe) Mitralklappe (nativ)	<i>Enterococcus sp.</i>	negativ	Negativ	Mitralklappe: Fibrose → Mitralklappeninsuffizienz, kein Hinweis auf eine Endokarditis Aortenklappe: Nahtmaterial der 2004 eingesetzten Kunstklappe: neutrophil- granulozytäre Entzündung	Kulturnegative Prothesenendokarditis → Erregeridentifizierung mittels 16S rRNA TEE → Abszesse an der Aortenwurzel sichtbar

21 (m,67a)	Mitralklappe (nativ)	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	Negativ	ulzeröse Endokarditis	Übereinstimmung
---------------	-------------------------	---------------------------	-------------------------------	---------	-----------------------	-----------------

Abkürzungen: m= männlich, w=weiblich,a= Alter, TEE= Transösophageale Echokardiographie

Die Blutkulturen detektierten in 6 von 21 Fällen (28,6 %) einen Erreger. In 5 dieser 6 Fälle (83,3%) stimmten die Ergebnisse der Blutkulturen mit den Sequenzier-Ergebnissen überein. Aus den Blutkulturen wurden folgende Erreger isoliert: KNS, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae* und ein nicht näher bezeichneter Staphylokokkus. In den 5 Fällen, in denen die 16S rRNA Sequenzierung und die Blutkulturen übereinstimmten, konnte die 16S rRNA- Methode in 3 Fällen (Pat.Nr.: 10, 13 und 14) die Bakterienspezies und in 2 Fällen (Pat.Nr.: 2 und 21) die Bakteriengattung identifizieren. Die Blutkulturen konnten in 4 Fällen (Pat.Nr.: 2, 10, 13 und 14) die Bakterienspezies und in einem Fall (Pat.Nr.: 21) die Bakteriengattung identifizieren.

Unter den Blutkultur-negativen Fällen wurde bei einer Patientin einige Tage vor Abnahme der Blutkulturen eine antibiotische Therapie verabreicht. Daher blieben wahrscheinlich die Blut- und Klappenkulturen negativ. In diesem Fall wurden mittels Sequenzierung Umweltisolate mit einem 17%-igem Anteil an *E.coli* identifiziert. Bei den PatientInnen mit der Nummer 1,5,6,9 und 11 wurden vor dem operativen Eingriff keine Blutkulturen abgenommen bzw. waren im Medocs keine Ergebnisse zu finden. In diesen Fällen waren die Blutkulturen nach der Operation negativ.

Bei 2 von 21 PatientInnen (9,5%) stimmten die Ergebnisse einer serologischen Untersuchung (= Nachweis von erregerspezifischen Antikörpern) mit denen der 16S rRNA Sequenzierung überein. Im ersten Fall (Pat.Nr.: 1) wurde *Bartonella quintana* als Erreger identifiziert. Die serologische Untersuchung detektierte Antikörper (Titer von 1:256) gegen *Bartonella henselae*. Dieser Patient zeigte als Risikoverhalten intravenösen Drogenabusus. Im zweiten Fall (Pat.Nr.: 5) wurde *Tropheryma whipplei* als Erreger identifiziert. Auch hier wurden in der serologischen Untersuchung Antikörper gegen *T. whipplei* nachgewiesen. Die Blut- und Klappenkulturen blieben in diesen beiden Fällen negativ.

Bei einer Patientin wurde der verursachende Erreger (*S. agalactiae*) aus dem Liquor kultiviert und stimmte mit dem Sequenzier-Ergebnis überein. Die Blut- und Klappenkulturen blieben negativ. Diese Patientin wurde mit ZNS-Symptomatik (globale Aphasie und Verdacht aus Insult) ins Krankenhaus eingewiesen. Bei sehr hohen CRP-werten wurde eine Liquorpunktion durchgeführt und *S.agalactiae* nachgewiesen.

Die Klappenkulturen zeigten in 17 von 21 Fällen (81%) negative Ergebnisse und in 3 Fällen (14,3%) konnte ein Keim nachgewiesen werden. Dabei wurde in zwei Fällen

(Pat.Nr.: 4 und 6) ein *Propionibacterium acnes* und in einem Fall (Pat.Nr.: 10) ein Erreger aus der Viridans-Gruppe der Streptokokken isoliert. Beim Letzteren stimmten die Blutkultur sowie die 16S rRNA Sequenzierung mit der Klappenkultur überein. In den beiden Fällen, in denen ein *P.acnes* in der Klappenkultur nachgewiesen wurde, erwies sich ein Fall als Negativkontrolle, da histologisch keine Endokarditis gesichert werden konnte und die positive Klappenkultur höchst wahrscheinlich auf eine Kontamination zurückzuführen ist. Im zweiten Fall mit *P.acnes* wurde mittels Sequenzierung ein *S. sanguinis* identifiziert. In diesem Fall blieb die Blutkultur negativ. Da in diesem Fall die Diagnose einer IEmittelshistopathologischer Untersuchung nicht eindeutig gestellt werden konnte, wurde er als unklar eingestuft.

In der mikroskopischen Untersuchung wurden im entnommenen Herzklappengewebe mittels H/E-Färbung in 4 von 21 Fällen (19%) (Pat.Nr.: 2,13,17 und 18) Kokken detektiert. Bei einem Patienten (Nr.: 5) wurden grampositive Stäbchen histologisch auf der entnommenen Herzklappe nachgewiesen. In 3 Fällen (14,3%) (Pat.Nr.: 2, 5 und 13) stimmten die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung mit den anderen Nachweismethoden überein. Bei Patientin Nummer 17 zeigten alle anderen Untersuchungsmethoden (16S rRNA Sequenzierung, Blut- und Klappenkultur) keinen Erreger. Da diese Patientin aus einem Krankenhaus außerhalb der Steiermark ins Universitätsklinikum Graz überwiesen wurde, konnte in vorherige Daten nicht eingesehen werden. Beim Patienten Nummer 18 wurde zusätzlich zur mikroskopischen Detektion von grampositiven Kokken in der Blutkultur *S. caprae* nachgewiesen. Die 16s rRNA- Sequenzierung und die Klappenkulturen lieferten in diesem Fall keinen Erregernachweis.

4 Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Ergebnisse des Erregernachweises mittels 16S rRNA Sequenzierung aus Herzklappengewebe mit konventionellen Nachweismethoden (Blut- und Klappenkultur) in der Erregerdiagnostik der IE zu vergleichen. Dabei wurden die Daten von 21 PatientInnen retrospektiv analysiert.

Die erfolgreiche Erregerisolierung aus Blutkulturen stellt einen der Grundpfeiler in der Diagnostik der IE dar und ist von entscheidender Bedeutung für eine adäquate Therapieplanung und Resistenzbestimmung (7,36). Jedoch bleiben Blutkulturen, je nach Angaben in der Literatur, in 2,5-31% der IE-Fälle negativ (55,82). Gründe für das Zustandekommen negativer Blutkulturen sind die Verabreichung von Antibiotika vor Abnahme der Blutkulturen oder das Vorliegen von anspruchsvollen Mikroorganismen, welche sich schwer oder gar nicht kultivieren lassen (7,36,55,181). Zu diesen anspruchsvollen Mikroorganismen, welche eine IE auslösen können, gehören zum Beispiel *Bartonella spp.*, HACEK-Keime, *Coxiella burnetii*, *T. whipplei*, *Brucella sp.*, Legionellen, Clostridien, Mycobakterien uvm. (7,71). In dieser Diplomarbeit konnte anhand der retrospektiven Datenanalyse gezeigt werden, dass die Methode der 16S rRNA Sequenzierung in der Identifizierung der verursachenden Mikroorganismen in 13 von 21 Fällen (61,9%) erfolgreich war bzw. mit den anderen Nachweismethoden übereinstimmte. Die Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzierung stimmten in 5 von 6 (83,3%) Fällen mit den positiven Blutkulturen überein. Darüber hinaus erwies sich dieselbe molekularbiologische Methode in fünf Fällen, in welchen die Blutkulturen negativ blieben, als erfolgreich in der Identifizierung der verursachenden IE-Erreger. Somit konnte in diesen Fällen anhand der Sequenzierergebnisse die richtige antibiotische Therapie eingeleitet werden. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass kulturunabhängige Nachweismethoden wie die Sequenzierung der 16S rRNA eine nützliche und ergänzende Technik in der Erregerdiagnostik einer IE sind, besonders beim Vorliegen kulturnegativer Endokarditiden (153,182–184).

Im Folgenden werden die einzelnen Fälle/PatientInnen aus Tabelle 6 näher diskutiert:

Beim Patienten Nummer 1 konnte mittels 16S rRNA Sequenzierung der Erreger *Bartonella quintana* als Verursacher der IE detektiert werden. Bereits vor mehr als 10 Jahren wurde in Studien der erfolgreiche Nachweis von Bartonellen mittels PCR und

nachfolgender Sequenzierung der 16S rDNA durchgeführt (185,186). Die Blut- und Klappenkulturen sowie die mikroskopische Untersuchung des entnommenen Herzklappengewebes konnten in diesem Fall keinen Erreger nachweisen. Mittels serologischer Untersuchung konnten Antikörper (Titer 1:256) gegen *Bartonella henselae* detektiert werden. Gemeinsam mit *Coxiella burnetii* gehören Bartonellen zu den häufigsten Erregern kulturnegativer Endokarditiden (71). Die Isolierung/der Nachweis von Bartonellen mit Hilfe konventioneller Diagnostikmethoden bedarf einer verlängerten Inkubation und speziellen Kultivierungsbedingungen. Aufgrund dessen wird die Labordiagnose oft indirekt durch den Nachweis spezifischer Antikörper gegen *B. quintana* und *B. henselae* durchgeführt. Dabei ist die Serodiagnostik nicht unproblematisch. Es kann passieren, dass gewisse Serotypen nicht mit dem eingesetzten Antigen reagieren oder unspezifische Reaktionen auftreten. Außerdem kann nicht zwischen *B. henselae* und *B. quintana* Antikörpern unterschieden werden (Kreuzreaktion)(187,188). Die zwei häufigsten Unterarten der Bartonellen, welche eine IE auslösen können sind *B. quintana* und *B. henselae* (189,190). Bei *B. quintana* handelt es sich um ein gramnegatives Stäbchen, das zu einer intraerythrozytären Bakteriämie führen kann. Dieses Bakterium ist der Erreger des Wolhynischen Fiebers (= Schützengraben- oder Fünftagefieber), welches an unhygienische Lebensbedingungen geknüpft ist und während des ersten Weltkrieges weit verbreitet war. Die Übertragung erfolgt durch die Kleider- oder Kopflaus. Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt durch Läusekot, in welchem sich die Erreger befinden und beim Kratzen in Epitheldefekte eingerieben werden. *B. quintana*-bedingte Bakteriämien und Endokarditiden werden seit Mitte der 1990-er häufiger beobachtet und betreffen heutzutage insbesondere Menschen, die unter schlechten hygienischen Bedingungen leben (zum Beispiel Obdachlose, Drogenabhängige und Alkoholiker) oder immunsupprimierte Personen, wie zum Beispiel HIV-Infizierte (151,191–194). Aus der Krankengeschichte des Patienten Nummer 1 geht hervor, dass die IE-assoziierten Beschwerden einen Monat nach intravenösen Drogenkonsum begonnen haben.

Als weiterer Vertreter von Mikroorganismen, welche eine kulturnegative IE auslösen können, wurde mit Hilfe der 16Sr RNA Sequenzierung beim Patienten Nummer 5 *T. whipplei* identifiziert. Auch die serologische Untersuchung detektierte Antikörper gegen *T. whipplei*. Die Blut- und Klappenkulturen konnten keinen Erreger nachweisen. Dafür konnten mittels mikroskopischer Untersuchung im

Herzklappengewebe grampositive Stäbchen detektiert werden. Dieses Bakterium ist durch ein besonders langsames Wachstum gekennzeichnet. Es lässt sich nur in Speziallaboratorien nach mehrmonatiger Kultur anzüchten und nur durch Spezialfärbungen (Periodsäure-Schiff-Färbung = PAS) im Mikroskop sichtbar machen. Daher entwickelten sich PCR-basierte Methoden mit nachfolgender Sequenzierung als Standardverfahren zum Nachweis dieses Bakteriums. Da *T. whipplei* ein ubiquitär in der Umwelt vorkommendes Stäbchenbakterium darstellt, sollte ein molekulargenetischer Nachweis wegen der weiten Verbreitung dieses Erregers mit Vorsicht interpretiert werden. Eine Infektion mit diesem Keim verursacht den Morbus Whipple, eine als "intestinale Lipodystrophie" beschriebene seltene chronische Multisystemerkrankung. Im Zusammenhang mit der IE kann *T. whipplei* eine schleichende, kulturnegative und afebrile Form verursachen (7,151,195). Die Inzidenzrate der *T.whipplei*-Endokarditis ist noch nicht etabliert und variiert von Land zu Land. In einem Zentrum in Marseille in Frankreich wurde eine Inzidenz von 2,6 % beschrieben (196). Die Inzidenz in Deutschland liegt mit 6,3% etwas höher (197).

Beim Patienten Nummer 8 wurde mittels 16SrRNA Sequenzierung *Aggregatibacter aphrophilus* als Verursacher der IE detektiert. Das gramnegative Bakterium *A. aphrophilus* (früher als *Haemophilus aphrophilus* bezeichnet) ist ein Besiedler im humanen oberen respiratorischen Trakt und gehört zur Gruppe der HACEK-Keime (*Haemophilus* Spezies, *Aggregatibacter* Spezies, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella* Spezies). 1,4 % aller IE-Fälle werden durch HACEK-Keime verursacht (68). Auch in diesem Fall blieben die Blut- und Klappenkulturen negativ. Dies wird dadurch erklärt, dass Erreger aus der HACEK-Gruppe nicht auf herkömmlichen, festen Nährböden (zum Beispiel MacConkey-Agar) für gramnegative Bakterien wachsen und auf bluthaltigen Medien eine mikroaerophile oder kapnophile Atmosphäre und eine verlängerte Inkubationszeit (bis 10 Tage) benötigen (151). Eine IE, welche durch *A. aphrophilus* verursacht wird, steht in 33 % der Fälle im Zusammenhang mit dentalen Erkrankungen und in 20% der Fälle mit einer Sinusitis oder einer Mittelohrentzündung. In der Mehrheit der Fälle ist die Mitralklappe betroffen, wie es auch beim Patienten Nummer 8 der Fall war (198). In einer Studie wurde beschrieben, dass eine HACEK-Endokarditis mit einem niedrigeren Durchschnittsalter als eine Non-HACEK-Endokarditis

vergesellschaftet ist (199). Auch unser Patient war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der IE erst 22 Jahre alt.

Bei der Patientin Nummer 3 war die Liquorkultur positiv auf *S. agalactiae*. Die Patientin wurde wegen globaler Aphasie und Verdacht auf Insult auf die Neurologie des Universitätsklinikums Graz transferiert. Nach Ausschluss eines Insults und aufgrund der hohen CRP-Werte wurde eine Liquorpunktion durchgeführt. Nach einigen Tagen Krankenhausaufenthalt und Verschlechterung des Zustandes der Patientin wurde eine TTE durchgeführt und der Verdacht auf eine Mitralklappen-IE gestellt. Die Blutkulturen vom Aufnahmetag waren negativ. Nach der ersten Abnahme von Blutkulturen am Aufnahmetag wurden der Patientin Antibiotika verabreicht, sodass weitere Blutkulturen wahrscheinlich deswegen negativ blieben. Mittels 16S rRNA Sequenzierung konnte aus dem entnommenen Herzklappengewebe ebenfalls *S. agalactiae* identifiziert werden. Dieses Bakterium gehört zu den β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B und kann bei Erwachsenen eine Reihe an Infektionen wie Endometritis, Pneumonie, Arthritis, Puerperalinfektionen, Meningitis und Endokarditis auslösen (151). Möglicherweise waren die ZNS-Beschwerden durch Emboli, welche im Rahmen einer IE durch Verschleppung von Vegetationsfragmenten (7) auftreten können, verursacht worden, da im Liquor sowie im Herzklappengewebe derselbe Erreger nachgewiesen wurde.

Bei der Patientin mit der Nummer 20 in Tabelle 6 wurden mittels 16S rRNA Sequenzierung Bakterien aus der Gruppe der Enterokokken nachgewiesen. Eine genauere Identifizierung des Erregers konnte nicht durchgeführt werden. Die Blut- und Klappenkulturen blieben negativ. Die Patientin hatte bereits im Jahr 2004 eine Aortenklappenprothese erhalten. Im März 2010 wurde eine erneute Operation durchgeführt, wobei die Aortenklappe reoperiert und die Mitralklappe herausgenommen und ersetzt wurde. In der histopathologischen Untersuchung der Mitralklappe konnte keine IE bestätigt werden. Im LKH West wurde aufgrund des septischen Zustandbildes der Patientin mit Verdacht auf Endokarditis eine TEE durchgeführt. Diese Untersuchung zeigte Abszesse an der Aortenwurzel und auch am Nahtmaterial der Aortenklappenprothese konnte eine neutrophil-granulozytäre Entzündung nachgewiesen werden. Somit konnte die Diagnose einer kulturnegativen Kunstklappenendokarditis gestellt werden, welche wahrscheinlich durch einen Keim aus der Spezies der Enterokokken verursacht worden ist. Immerhin gehören Enterokokken zu den drei häufigsten Erregergruppen einer IE (40). Darüber hinaus

wird in der Literatur beschrieben, dass intrakardiale Fremdkörper ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung einer IE sind (7,36).

Von den 6 Fällen mit positiven Blutkulturen, stimmten die Ergebnisse der 16SrRNA Sequenzierung in 5 Fällen (83,3%) mit diesen überein. In diesen 5 Fällen wurden ausschließlich grampositive Kokken detektiert. Unter ihnen fanden sich Staphylokokken (KNS, *S.aureus*, *S.warneri*) und Streptokokken (*S. agalactiae*, *S. oralis/ mitis*, *S. sanguinis*). Grampositive Kokken (Staphylokokken, Streptokokken, Enterokokken) sind für etwa 80% der IE-Fälle verantwortlich (40). Auch in dieser Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass von den 11 Fällen, in denen ein verursachender Mikroorganismus detektiert werden konnte, grampositive Erreger in 72,7% (8/11 PatientInnen) der Fälle für die IE verantwortlich waren.

Beim Patienten Nummer 14 wurde im Rahmen einer Kunstklappenendokarditis nach Aortenklappenersatz in den Blutkulturen ein *S. aureus* detektiert. Die Labordiagnose erfolgt bei *S. aureus* durch Anzucht des Keims auf Blutagar (151). Eine Studie, welche sich mit der Detektion von Mikroorganismen mittels Blutkulturen beschäftigte, hat gezeigt, dass *S. aureus* in ungefähr 90% der Fälle in der ersten abgenommenen Blutkultur detektiert wird (200). In den Ergebnissen wurde beschrieben, dass beim Patienten Nummer 14 mittels 16S rRNA Sequenzierung neben *S. aureus* auch *S. warneri* detektiert wurde. *S. warneri* gehört zu den KNS und könnte in diesem Fall einen Kontaminationskeim darstellen, obwohl in der Literatur auch Fälle von *S. warneri*-bedingter IE beschrieben wurden (201). Andererseits könnte auch eine Mischinfektion vorgelegen sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nur ein *S. aureus* die IE verursachte und durch die 16S rRNA Sequenzierung keine eindeutige Identifizierung möglich war. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass mittels 16S rRNA Sequenzierung die Bakterienspezies nicht immer eindeutig identifiziert werden kann (166,182,202). Gründe dafür könnten zum Beispiel ähnliche oder identische Nukleotidabfolgen mancher Spezies sein oder das Vorliegen ungenauer oder zu wenig hinterlegter Sequenzen in Datenbanken (164). Das Problem dabei liegt darin, dass die eindeutige Speziesidentifizierung, abhängig vom Erreger, von großer Bedeutung für die Einleitung des richtigen Antibiotikums ist. Zum Beispiel ist *S. aureus* in Österreich meist Methicillin-sensibel und *S. warneri* meist Methicillin-resistent.

Weitere Erreger, welche in den Blutkultur-positiven Fällen nachgewiesen wurden, waren KNS. In einer großen Studie, welche im Jahr 2009 publiziert wurde, werden

KNS als die zweithäufigsten Erreger der IE beschrieben (40). Vor allem bei Infektionen, welche im Zusammenhang mit der Verwendung von Kunststoffimplantaten stehen, spielen KNS (besonders *S. epidermidis*) eine Rolle. Laut Medocs-Angaben war der Patient Nummer 2 Träger eines komplett implantierten zentralen Venenkatheters (= Portakath), welcher als mögliche Infektionsquelle gedient haben könnte. Auch bei KNS liegt der Schwerpunkt der Labordiagnose in der Anzucht des Keims auf/in Basiskulturmedien. KNS sind Hauptbestandteil der Hautflora und treten häufig als Kontaminanten von Untersuchungsmaterial in Erscheinung. Daher sollte beim Nachweis von KNS durch enge Zusammenarbeit von KlinikerInnen und MikrobiologInnen geklärt werden, ob prädisponierende Faktoren für eine Infektion mit diesen Keimen vorliegen und ob der Patient entsprechende klinische Zeichen aufweist (151).

Unter den Streptokokken wurden Vertreter der Viridans-Gruppe wie *S. mitis*, *S. oralis* und *S. sanguinis* detektiert. Streptokokken der Viridans-Gruppe gehören zur physiologischen Schleimhautflora des Menschen und können eine Endocarditis lenta und Karies verursachen. Eine Endocarditislenta (=subakute Endokarditis) kann durch eine vorübergehende Bakteriämie nach kleinen Verletzungen im Mund, nach Zahnextraktionen oder Taschensanierungen bei entsprechenden Risikofaktoren (vorgeschädigte Herzklappen) entstehen. Der Schwerpunkt in der Labordiagnostik liegt in der Anzüchtung der Erreger aus Blutkulturen (151).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte in einem Fall (Pat.Nr.: 18) kein Erregernachweis mittels 16S rRNA Sequenzierung erfolgen. In diesem Fall wurde mittels Blutkulturen *S. caprae* identifiziert und auch in der mikroskopischen Untersuchung des Herzklappengewebes konnten grampositive, in Häufchen liegende Kokken nachgewiesen werden. In einer bereits zitierten Studie (203) konnte *S. caprae* mittels 16S rDNA Sequenzierung ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall erfolgte der Erregernachweis mittels Blutkultur und mikroskopischer Untersuchung des Herzklappengewebes. *S. caprae* gehört zu den KNS und wurde erstmals aus der Milch von gesunden Ziegen isoliert. Obwohl *S. caprae* unter den Vertretern der KNS im Gegensatz zu anderen Vertretern dieser Art, wie *S. epidermidis* oder *S. lugdunensis*, als klinisch weniger relevant eingestuft wurde, gibt es dennoch Fälle, in denen *S. caprae* in Verbindung mit Knochen- und Gelenkentzündungen, Bakteriämien, Sepsis, Meningitis und Endokarditis gebracht wird (151,151,204–208). Gründe für das Versagen der 16S rRNA Sequenzierung in

der Detektion von Bakterien können vielseitig sein. Ein kritischer Schritt, welcher für die Durchführung einer PCR mit nachfolgender Sequenzierung unabdingbar ist und zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, ist die Extraktion der DNA aus der verwendeten Gewebeprobe. Wie effizient die Extraktion der DNA durchgeführt wird, hängt von der verwendeten Extraktions-Technik, der Beschaffenheit der bakteriellen Zellwand, der Menge an Hintergrund DNA oder eukaryotischer DNA der Patientin/des Patienten, der Größe und Menge des zu amplifizierenden Fragments und von der Anwesenheit von Inhibitoren ab (148).

Beim Patienten Nummer 4 wurde mittels Sequenzierung neben Umweltkeimen (Kontaminationskeimen) mit einem 17%-igem Anteil *S. sanguinis* detektiert. Die Blutkulturen blieben negativ. In der Klappenkultur wurde ein *P. acnes* nachgewiesen. Die Ergebnisse dieses Falles waren insofern schwierig zu interpretieren, als mittels histopathologischer Untersuchung eine IE nicht eindeutig gesichert werden konnte. *S. sanguinis* gehört zur Gruppe der vergrünenden Streptokokken und wird in der Literatur als Verursacher einer Endocarditis lenta, vor allem bei Personen mit einer Herzklappenschädigung, beschrieben (151,209). Bei diesem Patienten wurden in der histopathologischen Untersuchung des entnommenen Herzklappengewebes stark verkalkte Klappenanteile und postentzündliche Residuen beschrieben. Möglicherweise lag bei diesem Patienten eine abgelaufene Endokarditis durch Streptokokken vor.

Bei der Patientin Nummer 7 wurde für einige Tage vor Abnahme der Blutkulturen eine Antibiotikatherapie verabreicht, sodass deswegen wahrscheinlich die Blutkulturen negativ blieben. Aber auch mit Hilfe der 16S rRNA Sequenzierung konnte kein eindeutiger Erreger nachgewiesen werden. Es wurden Kontaminationskeime wie *Aeromonas spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas spp.* und mit einem 17 %-igem Anteil *E.coli* detektiert. Laut der histopathologischen Untersuchung lag eine akute, phlegmonöse und teils abszedierende Endokarditis vor. In einem Artikel, welcher im Jahr 2006 publiziert wurde (149), wurde beschrieben, dass kulturunabhängige Methoden wie die PCR mit nachfolgender Sequenzierung von bakterieller DNA vor allem in kulturnegativen IE-Fällen aufgrund einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie nützlich für einen Erregernachweis sein können. In unserem Fall konnte jedoch kein (eindeutiger) Erreger nachgewiesen werden. Das Versagen eines eindeutigen Erregernachweises könnte in diesem Fall zum Beispiel durch eine Kontamination der verwendeten Gewebeprobe bedingt

gewesen sein. Amplifizierungstechniken wie die PCR sind sehr anfällig für Kontamination. Verunreinigungen können durch die allgegenwärtige Präsenz von kontaminierter bakterieller DNA entstehen, welche nicht nur in Gewebeproben zu finden ist, sondern auch in den verwendeten Reagenzien, Röhrchen oder auf Pipettenspitzen (148,149,157).

Beim Patienten Nummer 19 wurde mit Hilfe der 16S rRNA Sequenzierung ein *S. salivarius/ termophilus* identifiziert. Die Blut- und Klappenkulturen blieben negativ. Auch in der mikroskopischen Untersuchung konnte kein Erreger nachgewiesen werden. Die histopathologische Untersuchung ergab das Vorliegen einer fokalen, chronisch aktiven fibrinösen Endokarditis sowie Herzklappenanteile mit Sklerose. In einer Studie wurde *S. salivarius* in nur einer aus 6 Blutkulturen isoliert. In diesem Fall wurden auch mittels mikroskopischer Untersuchung Kokken im Herzklappengewebe detektiert. Der Erreger konnte letztendlich mittels 16S rDNA Sequenzierung identifiziert werden (147). *S. salivarius* gehört zur Viridans- Gruppe der Streptokokken und wird in der Literatur als möglicher Erreger einer IE beschrieben (211–213). Ob bei unserem Patienten nun wirklich eine IE, verursacht durch *S. salivarius/ termophilus*, vorgelegen ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, wäre aber möglich, da in der Histologie Anteile einer IE zu sehen waren.

Bei der Anwendung der 16S rRNA Sequenzierung für den Nachweis von Erregern sind die Limitationen dieser Technik zu berücksichtigen. Bei einer Kontamination des verwendeten Untersuchungsmaterials kann es zur Verzerrung/Verfälschung der Ergebnisse kommen. Verunreinigungen können durch die allgegenwärtige Präsenz von kontaminierter bakterieller DNA entstehen. Bei der Keimidentifizierung aus entnommenen Herzklappengewebe besteht die Gefahr einer Kontamination während der Fixation und Einbettung des Gewebes (168). Ein ebenfalls kritischer Schritt, welcher zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, ist die Extraktion der DNA aus der Gewebeprobe. Wie effizient diese Extraktion durchgeführt wird, hängt zum Beispiel von der verwendeten Extraktions-Technik, der Beschaffenheit der bakteriellen Zellwand, der Menge an Hintergrund DNA oder eukaryotischer DNA der Patientin/des Patienten oder der Größe und Menge des zu amplifizierenden Fragments ab (148,157). Bei der Anwendung neuerer Sequenzieretechniken wie der NGS können Sequenzierfehler bei jedem Arbeitsschritt entstehen und zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen (173–175).

Alle diese Limitationen können Schwierigkeiten bei der richtigen Interpretation der Ergebnisse bereiten.

Ein weiteres Problem der 16S rRNA Sequenzierung besteht darin, dass mit Hilfe dieser Methode die Bakterienspezies nicht immer eindeutig identifiziert werden kann. In jenen Fällen (Pat.Nr.: 2, 10, 13, 14 und 21), in denen die 16S rRNA Sequenzierung mit den Blutkultur- positiven Fällen übereinstimmte, konnten die Blutkulturen in 4 Fällen und die 16S rRNA Sequenzierung in 2 Fällen die Bakterienspezies eindeutig identifizieren. In den Blutkultur-negativen Fällen konnte die Sequenzier-Methode in 6 von 15 Fällen eindeutig die Bakterienspezies identifizieren. Die Resultate aus einer begrenzten Anzahl an Studien haben ergeben, dass die 16S rRNA Sequenzierung bei der Identifizierung der Bakterien-Gattung in den meisten Fällen (>90%) erfolgreich war. Die Bestimmung der Bakterienspezies gelang in 65-83% der Fälle. Probleme bei der genauen Identifizierung von Mikroorganismen mittels 16S rRNA Sequenzierung können zum Beispiel aufgrund ungenauer oder zu wenig hinterlegter Sequenzen in Datenbanken oder wegen ähnlicher oder identischer Nukleotidabfolgen mancher Spezies entstehen (164–167,213). Eine weitere Studie hat ebenfalls die Ergebnisse der Erregeridentifizierung mittels 16S rRNA Sequenzierung mit den Ergebnissen konventioneller Nachweismethoden verglichen. Dabei hat sich gezeigt, dass mit Hilfe der 16S rRNA Sequenzierung in 4 von 18 Fällen eine eindeutige Speziesidentifizierung möglich war. Die Blutkulturen konnten in 11 von 18 Fällen die Bakterienspezies eindeutig identifizieren (182). Obwohl die Identifizierung der Bakterienspezies für das Management der IE in den meisten Fällen von geringerer Bedeutung ist als die Identifizierung der Bakteriengattung, so kann sie in manchen Fällen substantiell für die Einleitung des adäquaten Therapieschemas sein (203). Ein Beispiel dafür wäre der Patient Nummer 14. In seinem Fall konnte mittels 16S rRNA Sequenzierung *S. aureus* als auch *S. warneri* identifiziert werden. Mit den alleinigen Ergebnissen der 16S rRNA Sequenzierung wäre es in diesem Fall schwierig gewesen die adäquate Therapie einzuleiten, da *S. aureus* in Österreich in den meisten Fällen Methicillin-sensibel und *S. warneri* häufig Methicillin-resistent ist. In diesem Fall konnte aus der Blutkultur *S. aureus* identifiziert werden.

Conclusio

Die Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzierung stimmten in 13 von 21 Fällen (61,9%) mit den Ergebnissen der anderen Diagnostikmethoden (Blut- und Klappenkultur, Liquorkultur, serologische Untersuchung, mikroskopische Untersuchung) überein. Aus der Auswertung der Daten geht hervor, dass die 16S rRNA Sequenzierung eine nützliche Methode für den Erregernachweis bei kulturnegativen Endokarditiden ist. Vor allem dann, wenn die Ursache für negative Blutkulturen das Vorliegen von anspruchsvollen Mikroorganismen (zum Beispiel *T. whipplei*, *B. quintana*, *A. aphrophilus*) ist, welche sich nur unter besonderen Bedingungen kultivieren lassen, besonders langsam wachsen oder intrazellulär vorliegen. In den kulturpositiven Fällen stimmten die Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzierung in 83,3 % (in 5 von 6 Fällen) mit den Ergebnissen der Blutkulturen überein. Obwohl sich die 16S rRNA Sequenzierung als eine nützliche Technik in der Erregeridentifizierung erwiesen hat, kann auf konventionelle Methoden in der Diagnostik der IE nicht verzichtet werden. Vor allem die Erstellung eines Antibiotogramms zur Resistenzbestimmung der Erreger ist für den gezielten Einsatz der Antibiotika unerlässlich. Außerdem sollten beim Einsatz der 16S rRNA Sequenzierung die Limitationen (Schwierigkeiten bei der Speziesidentifizierung, potentielle Kontamination der Probe) dieser Methode nicht außer Acht gelassen werden. Um diese Limitationen zu überbrücken ist bei der Interpretation der Sequenzierergebnisse eine enge Zusammenarbeit von SpezialistInnen aus den Fächern der Infektiologie, Pathologie, Mikrobiologie und Kardiologie erforderlich.

5 Literaturverzeichnis

1. Al-Nawas B, Block M, Ertl G, Franzen D, Gohlke- Bärwolf C, Herrmann M, u. a. Kommentierte Zusammenfassung der Leitlinien der European Society of Cardiology zur Infektiösen Endokarditis (Neuaufgabe 2009). *Kardiologie* 2010. 4(4):285–94.
2. Osler W. The Gulstonian Lectures on Malignant Endocarditis. *Br Med J* 1885. Mar 7;1(1262):467–70.
3. Moreillon P, Que Y-A. Infective endocarditis. *Lancet Lond Engl.* 10. Januar 2004;363(9403):139–49.
4. Verhagen DWM, Hermanides J, Korevaar JC, Bossuyt PMM, van den Brink R, Speelman P, u. a. Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder among survivors of left-sided native valve endocarditis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1. Juni 2009;48(11):1559–65.
5. Piper W. *Innere Medizin.* 2. überarbeitete Auflage 2013. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013. 121-125 S.
6. Habib G. Management of infective endocarditis. *Heart* 2006. 92(1):124–30.
7. Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, u. a. *Harrisons Innere Medizin.* 17 Auflage 2009. Bd. 1. 10707 Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH; 2009. 982-992 S.
8. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *The Lancet.* Februar 2016;387(10021):882–93.
9. Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Béguinot I, Bouvet A, Briançon S, u. a. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA.* 3. Juli 2002;288(1):75–81.
10. Thuny F, Di Salvo G, Disalvo G, Belliard O, Avierinos J-F, Pergola V, u. a. Risk of Embolism and Death in Infective Endocarditis: Prognostic value of Echocardiography: a Prospective Multicenter Study. *Circulation.* 5. Juli 2005;112(1):69–75.
11. Netzer ROM, Altwegg SC, Zollinher E, Täuber M, Carrel T, Seiler C. Infective endocarditis: determinants of long term outcome. *Heart.* Juli 2002;88(1):61–6.
12. Prattes J, Zoller-Schwetz I. Infektiöse Endokarditis-Epidemiologie, Diagnostik und Therapie. *Education.* Juni 2015;10(1):45–59.
13. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Chirouze C, Iung B, u. a. Preeminence of *Staphylococcus aureus* in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* Mai 2012;54(9):1230–9.
14. Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, u. a. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA.* 22. Juni 2005;293(24):3012–21.

15. Kemkes-Matthes B, Oehler G. Blutgerinnung und Thrombose. Georg Thieme Verlag; 2001. 196 S.
16. Habib G, Hoen B, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, u. a. 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). *Eur Heart J*. 1. Oktober 2009;30(19):2369–413.
17. Wolff, Weihrauch TR. Internistische Therapie. 20. Aufl. München: Elsevier Urban und Fischer; 2014. 143-149 S.
18. Moreillon P, Que Y-A. Infective endocarditis. *Lancet*. 10. Januar 2004;363(9403):139–49.
19. Moreillon P, Que YA, Bayer AS. Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infect Dis Clin North Am*. Juni 2002;16(2):297–318.
20. Que Y-A, Haefliger J-A, Piroth L, François P, Widmer E, Entenza JM, u. a. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med*. 16. Mai 2005;201(10):1627–35.
21. Hadley S. IDP200 Pathophysiology of Infectious Diseases, Fall 2004/2005 [Internet]. [zitiert 23. November 2015]. Verfügbar unter: [about:reader?url=http%3A%2F%2Focw.tufts.edu%2FContent%2F6%2Freadings%2F207697](http://www.focw.tufts.edu/content/6/readings/207697)
22. Miller SE, Maragakis LL. Central line-associated bloodstream infection prevention. *Curr Opin Infect Dis*. August 2012;25(4):412–22.
23. Shah H, Bosch W, Thompson KM, Hellinger WC. Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infection. *The Neurohospitalist*. Juli 2013;3(3):144–51.
24. Malinverni R, Overholser CD, Bille J, Glauser MP. Antibiotic prophylaxis of experimental endocarditis after dental extractions. *Circulation*. Januar 1988;77(1):182–7.
25. Moreillon P, Overholser CD, Malinverni R, Bille J, Glauser MP. Predictors of endocarditis in isolates from cultures of blood following dental extractions in rats with periodontal disease. *J Infect Dis*. Mai 1988;157(5):990–5.
26. Everett ED, Hirschmann JV. Transient bacteremia and endocarditis prophylaxis. A review. *Medicine (Baltimore)*. Januar 1977;56(1):61–77.
27. van der Meer JT, Thompson J, Valkenburg HA, Michel MF. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands. II. Antecedent procedures and use of prophylaxis. *Arch Intern Med*. September 1992;152(9):1869–73.
28. van der Meer JT, Thompson J, Valkenburg HA, Michel MF. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands. I. Patient characteristics. *Arch Intern Med*. September 1992;152(9):1863–8.

29. Strom BL, Abrutyn E, Berlin JA, Kinman JL, Feldman RS, Stolley PD, u. a. Dental and cardiac risk factors for infective endocarditis. A population-based, case-control study. *Ann Intern Med.* 15. November 1998;129(10):761–9.
30. Hogevik H, Olaison L, Andersson R, Lindberg J, Alestig K. Epidemiologic aspects of infective endocarditis in an urban population. A 5-year prospective study. *Medicine (Baltimore).* November 1995;74(6):324–39.
31. Berlin JA, Abrutyn E, Strom BL, Kinman JL, Levison ME, Korzeniowski OM, u. a. Incidence of infective endocarditis in the Delaware Valley, 1988-1990. *Am J Cardiol.* 1. November 1995;76(12):933–6.
32. Wallace SM, Walten BI, Kharbanda RK, Hardy R, Wilson AP, Swanton RH. Mortality from infective endocarditis: clinical predictors of outcome. *Heart.* Juli 2002;88(1):53–60.
33. Correa de Sa DD, Tleyjeh IM, Anavekar N, Schultz JC, Thomas J, Lahr BD, u. a. Epidemiological trends of infective endocarditis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* Mai 2010;85(5):422–6.
34. Day MD, Gauvreau K, Shulman S, Newburger JW. Characteristics of children hospitalized with infective endocarditis. *Circulation.* 17. Februar 2009;119(6):865–70.
35. Valente AM, Jain R, Scheurer M, Fowler VG, Corey GR, Bengur AR, u. a. Frequency of infective endocarditis among infants and children with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Pediatrics.* Januar 2005;115(1):e15–9.
36. Cahill TJ, Prendergast B. Infective endocarditis. *Lancet Lond Engl.* 1. September 2015;
37. Tleyjeh Imad MI, Abdel-Latif A, Rahbi H, Scott CG, Bailey KR, Steckelberg J, u. a. A Systematic Review of Population-Based Studies of Infective Endocarditis. *Chest J.* September 2007;132(3):1025–35.
38. Letaief A, Boughzala E, Kaabia N, Ernez S, Abid F, Chaabane TB, u. a. Epidemiology of infective endocarditis in Tunisia: a 10-year multicenter retrospective study. *Int J Infect Dis.* 11(5):430–3.
39. Nkomo VT. Epidemiology and prevention of valvular heart diseases and infective endocarditis in Africa. *Heart.* Dezember 2007;93(12):1510–9.
40. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miro JM, Fowler VG Jr, Bayer AS, u. a. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis- Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med* 2009. 169(5):463–73.
41. Hill EE, Herijgers P, Claus P, Vanderschueren S, Herregods M-C, Peetermans WE. Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study. *Eur Heart J.* Januar 2007;28(2):196–203.

42. Benito N, Miró JM, de Lazzari E, Cabell CH, del Río A, Altclas J, u. a. Health Care–Associated Native Valve Endocarditis in Patients with no History of Injection Drug Use: Current Importance of Non-Nosocomial Acquisition. *Ann Intern Med.* 5. Mai 2009;150(9):586–94.
43. Lyytikäinen O, Ruotsalainen E, Järvinen A, Valtonen V, Ruutu P. Trends and outcome of nosocomial and community-acquired bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus* in Finland, 1995-2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* Juni 2005;24(6):399–404.
44. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry S, Trivette SL, Briggs JP, u. a. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med.* 19. November 2002;137(10):791–7.
45. Lomas JM, Martínez-Marcos FJ, Plata A, Ivanova R, Gálvez J, Ruiz J, u. a. Healthcare-associated infective endocarditis: an undesirable effect of healthcare universalization. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* November 2010;16(11):1683–90.
46. Frontera JA, Gradon JD. Right- Side Endocarditis in Injection Drug Users: Review of Proposed Mechanisms of Pathogenesis. *Clin Infect Dis.* Februar 2000;30:374–9.
47. Arastéh K, Baenkler HW, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, u. a. *Duale Reihe- Innere Medizin. 2. Aufl.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009. 443- 449 S.
48. Chan P, Ogilby JD, Segal B. Tricuspid valve endocarditis. *Am Heart J.* Mai 1989;117(5):1140–6.
49. Crysandt M, Hempfing B, Wilms M. *Innere Medizin. 1. Aufl.* 2010. Marburg: KVM - Der Medizinverlag Dr. Kloster Verlags-GmbH; 2010. 60-64 S.
50. Pérez de Isla L, Zamorano J, Lennie V, Vázquez J, Ribera JM, Macaya C. Negative Blood Culture Infective Endocarditis in the Elderly: Long-Term Follow-Up. *Gerontology.* August 2007;53(5):245–9.
51. Tornos P, Iung B, Permanyer-Miralda G, Baron G, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, u. a. Infective endocarditis in Europe: lessons from the Euro heart survey. *Heart Br Card Soc.* Mai 2005;91(5):571–5.
52. Olmos C, Vilacosta I, Fernández C, López J, Sarriá C, Ferrera C, u. a. Contemporary epidemiology and prognosis of septic shock in infective endocarditis. *Eur Heart J.* Juli 2013;34(26):1999–2006.
53. Werdan K, Dietz S, Löffler B, Niemann S, Bushnaq H, Silber R-E, u. a. Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states. *Nat Rev Cardiol.* Januar 2014;11(1):35–50.
54. Servy A, Valeyrie-Allanore L, Alla F, Lechiche C, Nazeyrollas P, Chidiac C, u. a. Prognostic value of skin manifestations of infective endocarditis. *JAMA Dermatol.* Mai 2014;150(5):494–500.

55. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti J-P, u. a. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: the Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*.
56. Chang F-Y, MacDonald B, Peacock JE, Musher D, Triplett P, Mylotte JM, u. a. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltimore)*. September 2003;82(5):322–32.
57. Chu VH, Cabell CH, Abrutyn E, Corey GR, Hoen B, Miro JM, u. a. Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: report of 99 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15. November 2004;39(10):1527–30.
58. Revilla A, San Román JA, López J, Vilacosta I, Luaces M, Fernández-Avilés F. [Current profile of left-sided native valve endocarditis caused by coagulase-negative *Staphylococcus*]. *Rev Esp Cardiol*. Juni 2005;58(6):749–52.
59. Alonso-Valle H, Fariñas-Alvarez C, García-Palomo JD, Bernal JM, Martín-Durán R, Gutiérrez Díez JF, u. a. Clinical course and predictors of death in prosthetic valve endocarditis over a 20-year period. *J Thorac Cardiovasc Surg*. April 2010;139(4):887–93.
60. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. Oktober 2014;27(4):870–926.
61. López J, Revilla A, Vilacosta I, Villacorta E, González-Juanatey C, Gómez I, u. a. Definition, clinical profile, microbiological spectrum, and prognostic factors of early-onset prosthetic valve endocarditis. *Eur Heart J*. März 2007;28(6):760–5.
62. Chu VH, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Pappas PA, Jones P, u. a. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis--a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. *Heart Br Card Soc*. April 2009;95(7):570–6.
63. Bongiorni MG, Tascini C, Tagliaferri E, Di Cori A, Soldati E, Leonildi A, u. a. Microbiology of cardiac implantable electronic device infections. *Eur Eur Pacing Arrhythm Card Electrophysiol J Work Groups Card Pacing Arrhythm Card Cell Electrophysiol Eur Soc Cardiol*. September 2012;14(9):1334–9.
64. Villamil Cajoto I, Rodríguez Framil M, Van den Eynde Collado A, José Villacián Vicedo M, Canedo Romero C. Permanent transvenous pacemaker infections: An analysis of 59 cases. *Eur J Intern Med*. Oktober 2007;18(6):484–8.
65. Yew HS, Murdoch D. Global trends in infective endocarditis epidemiology. *Curr Infect Dis Rep*. August 2012;14(4):367–72.
66. Chirouze C, Athan E, Alla F, Chu VH, Ralph Corey G, Selton-Suty C, u. a. Enterococcal endocarditis in the beginning of the 21st century: analysis from the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. Dezember 2013;19(12):1140–7.

67. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *Lancet Lond Engl*. 1. September 2015;
68. Chambers ST, Murdoch D, Morris A, Holland D, Pappas P, Almela M, u. a. HACEK Infective Endocarditis: Characteristics and Outcomes from a Large, Multi-National Cohort. *PLoS ONE*. 17. Mai 2013;8(5):e63181.
69. Baddley JW, Benjamin DK, Patel M, Miró J, Athan E, Barsic B, u. a. Candida infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. Juli 2008;27(7):519–29.
70. Pierrotti LC, Baddour LM. Fungal endocarditis, 1995-2000. *Chest*. Juli 2002;122(1):302–10.
71. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev*. Januar 2001;14(1):177–207.
72. Deyell MW, Chiu B, Ross DB, Alvarez N. Q fever endocarditis: A case report and review of the literature. *Can J Cardiol*. Juli 2006;22(9):781–5.
73. Alton GG, Forsyth JRL. Brucella. In: Baron S, Herausgeber. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th Aufl. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [zitiert 20. November 2015]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8572/>
74. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler Jr VG, Ryan T, u. a. Proposed Modifications to the Duke Criteria for Diagnosis of Infective Endocarditis. *Clin Infect Dis*. 30(4):633–8.
75. Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. *Am J Med*. März 1994;96(3):200–9.
76. Fournier PE, Casalta JP, Habib G, Messana T, Raoult D. Modification of the diagnostic criteria proposed by the Duke Endocarditis Service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis. *Am J Med*. Juni 1996;100(6):629–33.
77. Hoen B, Béguinot I, Rabaud C, Jaussaud R, Selton-Suty C, May T, u. a. The Duke criteria for diagnosing infective endocarditis are specific: analysis of 100 patients with acute fever or fever of unknown origin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. August 1996;23(2):298–302.
78. Dodds GA, Sexton DJ, Durack DT, Bashore TM, Corey GR, Kisslo J. Negative predictive value of the Duke criteria for infective endocarditis. *Am J Cardiol*. 15. Februar 1996;77(5):403–7.
79. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, u. a. Proposed Modifications to the Duke Criteria for the Diagnosis of Infective Endocarditis. *Clin Infect Dis*. 4. Januar 2000;30(4):633–8.
80. Kemp WE, Citrin B, Byrd BF. Echocardiography in infective endocarditis. *South Med J*. August 1999;92(8):744–54.

81. Erbel R, Rohmann S, Drexler M, Mohr-Kahaly S, Gerharz CD, Iversen S, u. a. Improved diagnostic value of echocardiography in patients with infective endocarditis by transoesophageal approach. A prospective study. *Eur Heart J.* Januar 1988;9(1):43–53.
82. Lamas CC, Eykyn SJ. Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. *Heart.* März 2003;89(3):258–62.
83. Cockerill FR, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, u. a. Optimal Testing Parameters for Blood Cultures. *Clin Infect Dis.* 15. Juni 2004;38(12):1724–30.
84. Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, Brecher S, Carroll KC, Stamper PD, u. a. Timing of specimen collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia. *J Clin Microbiol.* April 2008;46(4):1381–5.
85. Meine TJ, Nettles RE, Anderson DJ, Cabell CH, Corey GR, Sexton DJ, u. a. Cardiac conduction abnormalities in endocarditis defined by the Duke criteria. *Am Heart J.* August 2001;142(2):280–5.
86. Snygg-Martin U, Gustafsson L, Rosengren L, Alsiö A, Ackerholm P, Andersson R, u. a. Cerebrovascular complications in patients with left-sided infective endocarditis are common: a prospective study using magnetic resonance imaging and neurochemical brain damage markers. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1. Juli 2008;47(1):23–30.
87. Duval X, Iung B, Klein I, Brochet E, Thabut G, Arnoult F, u. a. Effect of early cerebral magnetic resonance imaging on clinical decisions in infective endocarditis: a prospective study. *Ann Intern Med.* 20. April 2010;152(8):497–504, W175.
88. Goulenok T, Klein I, Mazighi M, Messika-Zeitoun D, Alexandra JF, Mourvillier B, u. a. Infective endocarditis with symptomatic cerebral complications: contribution of cerebral magnetic resonance imaging. *Cerebrovasc Dis Basel Switz.* 2013;35(4):327–36.
89. Feuchtner G, Stolzmann P, Dichtl W, Schertler T, Bonatti J, Scheffel H, u. a. Multislice computed tomography in infective endocarditis: comparison with transesophageal echocardiography and intraoperative findings. *J Am Coll Cardiol.* 3. Februar 2009;53(5):436–44.
90. Fagman E, Perrotta S, Bech-Hanssen O, Flick A, Lamm C, Olaison L, u. a. ECG-gated computed tomography: a new role for patients with suspected aortic prosthetic valve endocarditis. *Eur Radiol.* November 2012;22(11):2407–14.
91. Bruun NE, Habib G, Thuny F, Sogaard P. Cardiac imaging in infectious endocarditis. *Eur Heart J.* 7. März 2014;35(10):624–32.
92. Raoult D, Houpiqian P, Tissot Dupont H, Riss JM, Arditi-Djiane J, Brouqui P. Treatment of Q fever endocarditis: comparison of 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Intern Med.* 25. Januar 1999;159(2):167–73.

93. Durack DT, Pelletier LL, Petersdorf RG. Chemotherapy of Experimental Streptococcal Endocarditis. *J Clin Invest.* März 1974;53(3):829–33.
94. Wilson WR, Geraci JE, Wilkowske CJ, Washington JA. Short-term intramuscular therapy with procaine penicillin plus streptomycin for infective endocarditis due to viridans streptococci. *Circulation.* Juni 1978;57(6):1158–61.
95. Gould FK, Denning DW, Elliott TSJ, Foweraker J, Perry JD, Prendergast BD, u. a. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 2. Januar 2012;67(2):269–89.
96. Tattevin P, Revest M, Lefort A, Michelet C, Lortholary O. Fungal endocarditis: current challenges. *Int J Antimicrob Agents.* Oktober 2014;44(4):290–4.
97. de Kerchove L, Vanoverschelde J-L, Poncelet A, Glineur D, Rubay J, Zech F, u. a. Reconstructive surgery in active mitral valve endocarditis: feasibility, safety and durability. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* April 2007;31(4):592–9.
98. Prendergast BD, Tornos P. Surgery for Infective Endocarditis Who and When? *Circulation.* 3. September 2010;121(9):1141–52.
99. Thuny F, Beurtheret S, Mancini J, Gariboldi V, Casalta J-P, Riberi A, u. a. The timing of surgery influences mortality and morbidity in adults with severe complicated infective endocarditis: a propensity analysis. *Eur Heart J.* August 2011;32(16):2027–33.
100. Aksoy O, Sexton DJ, Wang A, Pappas PA, Kourany W, Chu V, u. a. Early surgery in patients with infective endocarditis: a propensity score analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1. Februar 2007;44(3):364–72.
101. Vikram HR, Buenconsejo J, Hasbun R, Quagliarello VJ. Impact of valve surgery on 6-month mortality in adults with complicated, left-sided native valve endocarditis: a propensity analysis. *JAMA.* 24. Dezember 2003;290(24):3207–14.
102. Kang D-H, Kim Y-J, Kim S-H, Sun BJ, Kim D-H, Yun S-C, u. a. Early Surgery versus Conventional Treatment for Infective Endocarditis. *N Engl J Med.* 28. Juni 2012;366(26):2466–73.
103. Di Salvo G, Thuny F, Rosenberg V, Pergola V, Belliard O, Derumeaux G, u. a. Endocarditis in the elderly: clinical, echocardiographic, and prognostic features. *Eur Heart J.* September 2003;24(17):1576–83.
104. Habib G, Avierinos J-F, Thuny F. Aortic valve endocarditis: is there an optimal surgical timing? *Curr Opin Cardiol.* März 2007;22(2):77–83.
105. Anguera I, Miro JM, Vilacosta I, Almirante B, Anguita M, Muñoz P, u. a. Aortocavitary fistulous tract formation in infective endocarditis: clinical and echocardiographic features of 76 cases and risk factors for mortality. *Eur Heart J.* Februar 2005;26(3):288–97.

106. Gelsomino S, Maessen JG, van der Veen F, Livi U, Renzulli A, Lucà F, u. a. Emergency surgery for native mitral valve endocarditis: the impact of septic and cardiogenic shock. *Ann Thorac Surg*. Mai 2012;93(5):1469–76.
107. Nadji G, Rusinaru D, Rémedi J-P, Jeu A, Sorel C, Tribouilloy C. Heart failure in left-sided native valve infective endocarditis: characteristics, prognosis, and results of surgical treatment. *Eur J Heart Fail*. Juli 2009;11(7):668–75.
108. Kiefer T, Park L, Tribouilloy C, Cortes C, Casillo R, Chu V, u. a. Association between valvular surgery and mortality among patients with infective endocarditis complicated by heart failure. *JAMA*. 23. November 2011;306(20):2239–47.
109. Mügge A, Daniel WG, Frank G, Lichtlen PR. Echocardiography in infective endocarditis: reassessment of prognostic implications of vegetation size determined by the transthoracic and the transesophageal approach. *J Am Coll Cardiol*. September 1989;14(3):631–8.
110. Habib G, Badano L, Tribouilloy C, Vilacosta I, Zamorano JL, Galderisi M, u. a. Recommendations for the practice of echocardiography in infective endocarditis. *Eur J Echocardiogr J Work Group Echocardiogr Eur Soc Cardiol*. März 2010;11(2):202–19.
111. Revilla A, López J, Vilacosta I, Villacorta E, Rollán MJ, Echevarría JR, u. a. Clinical and prognostic profile of patients with infective endocarditis who need urgent surgery. *Eur Heart J*. Januar 2007;28(1):65–71.
112. Habib G, Avierinos J-F, Thuny F. Aortic valve endocarditis: is there an optimal surgical timing? *Curr Opin Cardiol*. März 2007;22(2):77–83.
113. López J, Sevilla T, Vilacosta I, García H, Sarriá C, Pozo E, u. a. Clinical Significance of Congestive Heart Failure in Prosthetic Valve Endocarditis. A Multicenter Study With 257 Patients. *Rev Esp Cardiol Engl Ed*. Mai 2013;66(5):384–90.
114. Habib G, Tribouilloy C, Thuny F, Giorgi R, Brahim A, Amazouz M, u. a. Prosthetic valve endocarditis: who needs surgery? A multicentre study of 104 cases. *Heart Br Card Soc*. Juli 2005;91(7):954–9.
115. Anguera I, Miro JM, Evangelista A, Cabell CH, San Roman JA, Vilacosta I, u. a. Periannular complications in infective endocarditis involving native aortic valves. *Am J Cardiol*. 1. November 2006;98(9):1254–60.
116. Anguera I, Miro JM, San Roman JA, de Alarcon A, Anguita M, Almirante B, u. a. Periannular complications in infective endocarditis involving prosthetic aortic valves. *Am J Cardiol*. 1. November 2006;98(9):1261–8.
117. Chan K-L. Early clinical course and long-term outcome of patients with infective endocarditis complicated by perivalvular abscess. *CMAJ Can Med Assoc J*. 9. Juli 2002;167(1):19–24.
118. Graupner C, Vilacosta I, SanRomán J, Ronderos R, Sarriá C, Fernández C, u. a. Periannular extension of infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 3. April 2002;39(7):1204–11.

119. Jenkins NP, Habib G, Prendergast BD. Aorto-cavitary fistulae in infective endocarditis: understanding a rare complication through collaboration. *Eur Heart J*. 1. Februar 2005;26(3):213–4.
120. Anguera I, Miro JM, Vilacosta I, Almirante B, Anguita M, Muñoz P, u. a. Aorto-cavitary fistulous tract formation in infective endocarditis: clinical and echocardiographic features of 76 cases and risk factors for mortality. *Eur Heart J*. Februar 2005;26(3):288–97.
121. Hill EE, Herijgers P, Claus P, Vanderschueren S, Peetermans WE, Herregods M-C. Abscess in infective endocarditis: the value of transesophageal echocardiography and outcome: a 5-year study. *Am Heart J*. November 2007;154(5):923–8.
122. López J, Sevilla T, Vilacosta I, Sarriá C, Revilla A, Ortiz C, u. a. Prognostic role of persistent positive blood cultures after initiation of antibiotic therapy in left-sided infective endocarditis. *Eur Heart J*. 14. Juni 2013;34(23):1749–54.
123. Ellis ME, Al-Abdely H, Sandridge A, Greer W, Ventura W. Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. Januar 2001;32(1):50–62.
124. Malhotra A, Rayner J, Williams TM, Prendergast B. Infective endocarditis: therapeutic options and indications for surgery. *Curr Cardiol Rep*. April 2014;16(4):464.
125. Remadi JP, Habib G, Nadji G, Brahim A, Thuny F, Casalta JP, u. a. Predictors of death and impact of surgery in *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. *Ann Thorac Surg*. April 2007;83(4):1295–302.
126. Chirouze C, Cabell CH, Fowler VG, Khayat N, Olaison L, Miro JM, u. a. Prognostic factors in 61 cases of *Staphylococcus aureus* prosthetic valve infective endocarditis from the International Collaboration on Endocarditis merged database. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1. Mai 2004;38(9):1323–7.
127. Thuny F, Avierinos J-F, Tribouilloy C, Giorgi R, Casalta J-P, Milandre L, u. a. Impact of cerebrovascular complications on mortality and neurologic outcome during infective endocarditis: a prospective multicentre study. *Eur Heart J*. Mai 2007;28(9):1155–61.
128. Hess A, Klein I, Jung B, Lavallée P, Ilic-Habensus E, Dornic Q, u. a. Brain MRI findings in neurologically asymptomatic patients with infective endocarditis. *AJNR Am J Neuroradiol*. August 2013;34(8):1579–84.
129. Peters PJ, Harrison T, Lennox JL. A dangerous dilemma: management of infectious intracranial aneurysms complicating endocarditis. *Lancet Infect Dis*. November 2006;6(11):742–8.
130. Dickerman SA, Abrutyn E, Barsic B, Bouza E, Cecchi E, Moreno A, u. a. The relationship between the initiation of antimicrobial therapy and the incidence of stroke in infective endocarditis: an analysis from the ICE Prospective Cohort Study (ICE-PCS). *Am Heart J*. Dezember 2007;154(6):1086–94.

131. Vilacosta I, Graupner C, San Román JA, Sarriá C, Ronderos R, Fernández C, u. a. Risk of embolization after institution of antibiotic therapy for infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 1. Mai 2002;39(9):1489–95.
132. Steckelberg JM, Murphy JG, Ballard D, Bailey K, Tajik AJ, Taliercio CP, u. a. Emboli in infective endocarditis: the prognostic value of echocardiography. *Ann Intern Med*. 15. April 1991;114(8):635–40.
133. Erbel R, Liu F, Ge J, Rohmann S, Kupferwasser I. Identification of high-risk subgroups in infective endocarditis and the role of echocardiography. *Eur Heart J*. Mai 1995;16(5):588–602.
134. Pergola V, Di Salvo G, Habib G, Avierinos JF, Philip E, Vailloud JM, u. a. Comparison of clinical and echocardiographic characteristics of *Streptococcus bovis* endocarditis with that caused by other pathogens. *Am J Cardiol*. 15. Oktober 2001;88(8):871–5.
135. Rohmann S, Erbel R, Gorge G, Makowski T, Mohr-Kahaly S, Nixdorff U, u. a. Clinical relevance of vegetation localization by transoesophageal echocardiography in infective endocarditis. *Eur Heart J*. April 1992;13(4):446–52.
136. Di Salvo G, Habib G, Pergola V, Avierinos JF, Philip E, Casalta JP, u. a. Echocardiography predicts embolic events in infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 15. März 2001;37(4):1069–76.
137. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, u. a. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. Oktober 2012;42(4):S1–44.
138. Shapira Y, Weisenberg DE, Vaturi M, Sharoni E, Raanani E, Sahar G, u. a. The impact of intraoperative transesophageal echocardiography in infective endocarditis. *Isr Med Assoc J IMAJ*. April 2007;9(4):299–302.
139. Lacassin F, Hoen B, Leport C, Selton-Suty C, Delahaye F, Goulet V, u. a. Procedures associated with infective endocarditis in adults. A case control study. *Eur Heart J*. Dezember 1995;16(12):1968–74.
140. Van der Meer JT, Van Wijk W, Thompson J, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA, Michel MF. Efficacy of antibiotic prophylaxis for prevention of native-valve endocarditis. *Lancet Lond Engl*. 18. Januar 1992;339(8786):135–9.
141. Lockhart PB, Brennan MT, Thornhill M, Michalowicz BS, Noll J, Bahrani-Mougeot FK, u. a. Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis-related bacteremia. *J Am Dent Assoc* 1939. Oktober 2009;140(10):1238–44.
142. Chambers JB, Shanson D, Hall R, Pepper J, Venn G, McGurk M. Antibiotic prophylaxis of endocarditis: the rest of the world and NICE. *J R Soc Med*. April 2011;104(4):138–40.

143. Danchin N, Duval X, Leport C. Prophylaxis of infective endocarditis: French recommendations 2002. *Heart*. Juni 2005;91(6):715–8.
144. Richey R, Wray D, Stokes T. Prophylaxis against infective endocarditis: summary of NICE guidance. *BMJ*. 5. April 2008;336(7647):770–1.
145. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, u. a. Prevention of Infective Endocarditis Guidelines From the American Heart Association: A Guideline From the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 10. September 2007;116(15):1736–54.
146. de Oliveira JC, Martinelli M, Nishioka SAD, Varejão T, Uipe D, Pedrosa AAA, u. a. Efficacy of antibiotic prophylaxis before the implantation of pacemakers and cardioverter-defibrillators: results of a large, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. Februar 2009;2(1):29–34.
147. Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, Célard M, Benito Y, Lepidi H, u. a. Molecular Diagnosis of Infective Endocarditis by PCR Amplification and Direct Sequencing of DNA from Valve Tissue. *J Clin Microbiol*. Februar 2003;41(2):763–6.
148. Moter A, Musci M, Schmiedel D. Molecular Methods for Diagnosis of Infective Endocarditis. *Infect Dis Clin North Am*. Juni 2002;16(2):393 – x.
149. Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Juni 2006;47(1):1–13.
150. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, u. a. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 3. Auflage 2005. Weinheim: Wiley-VCH Verlag;
151. Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 7. Auflage 2012. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 140-420 S.
152. Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R, Rued C, Böttger EC, Altwegg M. Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15. Juli 2003;37(2):167–72.
153. Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, u. a. Molecular diagnosis of infective endocarditis—a new Duke’s criterion. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(9):673–80.
154. Grijalva M, Horváth R, Dendis M, Erný J, Benedik J. Molecular diagnosis of culture negative infective endocarditis: clinical validation in a group of surgically treated patients. *Heart*. März 2003;89(3):263–8.
155. Casalta JP, Gouriet F, Roux V, Thuny F, Habib G, Raoult D. Evaluation of the LightCycler SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis.

- Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. Juni 2009;28(6):569–73.
156. Baty G, Lanotte P, Hocqueloux L, Prazuck T, Bret L, Romano M, u. a. [PCR rDNA 16S used for the etiological diagnosis of blood culture negative endocarditis]. *Médecine Mal Infect.* Juni 2010;40(6):358–62.
 157. Rice PA, Madico GE. Polymerase Chain Reaction to Diagnose Infective Endocarditis Will It Replace Blood Cultures? *Circulation.* 22. März 2005;111(11):1352–4.
 158. Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oktober 1978;75(10):4801–5.
 159. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev.* Oktober 2004;17(4):840–62.
 160. Jenkins C, Ling CL, Ciesielczuk HL, Lockwood J, Hopkins S, McHugh TD, u. a. Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *J Med Microbiol.* 1. April 2012;61:483–8.
 161. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science.* 21. Mai 1999;284(5418):1308–10.
 162. Rothman RE, Majmudar MD, Kelen GD, Madico G, Gaydos CA, Walker T, u. a. Detection of Bacteremia in Emergency Department Patients at Risk for Infective Endocarditis Using Universal 16S rRNA Primers in a Decontaminated Polymerase Chain Reaction Assay. *J Infect Dis.* 12. Januar 2002;186(11):1677–81.
 163. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol.* März 1995;33(3):596–601.
 164. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol.* September 2007;45(9):2761–4.
 165. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral J-P, Raoult D. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J Clin Microbiol.* Oktober 2000;38(10):3623–30.
 166. Mignard S, Flandrois JP. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods.* Dezember 2006;67(3):574–81.
 167. Woo PCY, Ng KHL, Lau SKP, Yip K, Fung AMY, Leung K, u. a. Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. *J Clin Microbiol.* Mai 2003;41(5):1996–2001.

168. Lepidi H, Durack DT, Raoult D. Diagnostic methods current best practices and guidelines for histologic evaluation in infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am.* Juni 2002;16(2):339–61.
169. Imrit K, Goldfischer M, Wang J, Green J, Levine J, Lombardo J, u. a. Identification of Bacteria in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Heart Valve Tissue via 16S rRNA Gene Nucleotide Sequencing. *J Clin Microbiol.* Juli 2006;44(7):2609–11.
170. Rovey C, Greub G, Lepidi H, Casalta J-P, Habib G, Collart F, u. a. PCR Detection of Bacteria on Cardiac Valves of Patients with Treated Bacterial Endocarditis. *J Clin Microbiol.* Januar 2005;43(1):163–7.
171. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *J Invest Dermatol.* August 2013;133(8):e11.
172. Nguyen L, Burnett L. Automation of Molecular-Based Analyses: A Primer on Massively Parallel Sequencing. *Clin Biochem Rev.* August 2014;35(3):169–76.
173. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, u. a. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 24. Juli 2012;13(1):341.
174. Ross MG, Russ C, Costello M, Hollinger A, Lennon NJ, Hegarty R, u. a. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol.* 2013;14(5):R51.
175. Cecilia Williams FP. A High Frequency of Sequence Alterations Is Due to Formalin Fixation of Archival Specimens. *Am J Pathol.* 1999;155(5):1467–71.
176. Robasky K, Lewis NE, Church GM. The Role of Replicates for Error Mitigation in Next-Generation Sequencing. *Nat Rev Genet.* Januar 2014;15(1):56–62.
177. Bragg L, Stone G, Imelfort M, Hugenholtz P, Tyson GW. Fast, accurate error-correction of amplicon pyrosequences using Acacia. *Nat Methods.* Mai 2012;9(5):425–6.
178. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinforma Oxf Engl.* 1. Oktober 2010;26(19):2460–1.
179. Schmieder R, Edwards R. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. *PloS One.* 2011;6(3):e17288.
180. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, u. a. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* Mai 2010;7(5):335–6.
181. Lamas C. Diagnostic Strategy for Blood Culture-Negative Endocarditis. *Clin Infect Dis.* 15. Juli 2010;51(2):141–2.
182. Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol.* November 1997;35(11):2733–9.

183. Kumar NV, Menon T, Pathipati P, Cherian KM. 16S rRNA sequencing as a diagnostic tool in the identification of culture-negative endocarditis in surgically treated patients. *J Heart Valve Dis.* November 2013;22(6):846–9.
184. Vondracek M, Sartipy U, Aufwerber E, Julander I, Lindblom D, Westling K. 16S rDNA sequencing of valve tissue improves microbiological diagnosis in surgically treated patients with infective endocarditis. *J Infect.* Juni 2011;62(6):472–8.
185. Hadfield TL, Warren R, Kass M, Brun E, Levy C. Endocarditis caused by *Rochalimaea henselae*. *Hum Pathol.* Oktober 1993;24(10):1140–1.
186. Jalava J, Kotilainen P, Nikkari S, Skurnik M, Vanttinen E, Lehtonen OP, u. a. Use of the polymerase chain reaction and DNA sequencing for detection of *Bartonella quintana* in the aortic valve of a patient with culture-negative infective endocarditis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* Oktober 1995;21(4):891–6.
187. Adal KA, Cockerell CJ, Petri WA. Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. *N Engl J Med.* 26. Mai 1994;330(21):1509–15.
188. Drancourt M, Birtles R, Chaumentin G, Vandenesch F, Etienne J, Raoult D. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet Lond Engl.* 17. Februar 1996;347(8999):441–3.
189. Foucault C, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* Characteristics and Clinical Management. *Emerg Infect Dis.* Februar 2006;12(2):217–23.
190. Dreier J, Vollmer T, Freytag CC, Bäumer D, Körfer R, Kleesiek K. Culture-negative infectious endocarditis caused by *Bartonella* spp.: 2 case reports and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* August 2008;61(4):476–83.
191. Rodenwaldt E, Bader R-E. *Lehrbuch der Hygiene.* Springer-Verlag; 2013. 835 S.
192. Brouqui P, Lascola B, Roux V, Raoult D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med.* 21. Januar 1999;340(3):184–9.
193. Jackson LA, Spach DH, Kippen DA, Sugg NK, Regnery RL, Sayers MH, u. a. Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in downtown Seattle. *J Infect Dis.* April 1996;173(4):1023–6.
194. Spach DH, Kanter AS, Dougherty MJ, Larson AM, Coyle MB, Brenner DJ, u. a. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N Engl J Med.* 16. Februar 1995;332(7):424–8.
195. La Scola B, Fenollar F, Fournier PE, Altwegg M, Mallet MN, Raoult D. Description of *Tropheryma whippelii* gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus. *Int J Syst Evol Microbiol.* Juli 2001;51(Pt 4):1471–9.
196. Fournier P-E, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta J-P, Arzouni J-P, u. a. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15. Juli 2010;51(2):131–40.

197. Fenollar F, Célard M, Lagier J-C, Lepidi H, Fournier P-E, Raoult D. Tropheryma whipplei Endocarditis. *Emerg Infect Dis*. November 2013;19(11):1721–30.
198. HACEK Group Infections: Background, Pathophysiology, Epidemiology. 18. September 2015 [zitiert 2. Januar 2016]; Verfügbar unter: <http://emedicine.medscape.com/article/218158-overview>
199. Das M, Badley AD, Cockerill FR, Steckelberg JM, Wilson WR. Infective endocarditis caused by HACEK microorganisms. *Annu Rev Med*. 1997;48:25–33.
200. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? *J Clin Microbiol*. November 2007;45(11):3546–8.
201. Stöllberger C, Wechsler-Fördös A, Geppert F, Gulz W, Brownstone E, Nicolakis M, u. a. Staphylococcus warneri endocarditis after implantation of a lumbar disc prosthesis in an immunocompetent patient. *J Infect*. Januar 2006;52(1):e15–8.
202. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral J-P, Raoult D. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J Clin Microbiol*. Oktober 2000;38(10):3623–30.
203. Podglajen I, Bellery F, Poyart C, Coudol P, Buu-Hoï A, Bruneval P, u. a. Comparative Molecular and Microbiologic Diagnosis of Bacterial Endocarditis. *Emerg Infect Dis*. Dezember 2003;9(12):1543–7.
204. Benedetti P, Pellizzer G, Furlan F, Nicolini R, Rassa M, Sefton A. Staphylococcus caprae meningitis following intraspinal device infection. *J Med Microbiol*. Juli 2008;57(Pt 7):904–6.
205. Shuttleworth R, Behme RJ, McNabb A, Colby WD. Human isolates of Staphylococcus caprae: association with bone and joint infections. *J Clin Microbiol*. Oktober 1997;35(10):2537–41.
206. Takemura K, Takagi S, Baba T, Goto Y, Nonogi H. [A 72-year-old man with recurrent sepsis due to Staphylococcus caprae]. *J Cardiol*. Oktober 2000;36(4):269–71.
207. Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Ruffo G, Carli S, Varisco G, u. a. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus caprae and Staphylococcus epidermidis isolated from two Italian goat herds. *J Dairy Sci*. Mai 2005;88(5):1694–704.
208. Kini GD, Parris AR, Tang JS. A Rare Presentation of Sepsis from Staphylococcus caprae. *Open Microbiol J*. 30. April 2009;3:67–8.
209. Rao M, John G, Ganesh A, Jose J, Lalitha MK, John L. Infective endocarditis due to Streptococcus sanguis I occurring on a normal mitral valve. *J Assoc Physicians India*. November 1990;38(11):866–8.
210. Corredoira JC, Alonso MP, García JF, Casariego E, Coira A, Rodriguez A, u. a. Clinical characteristics and significance of Streptococcus salivarius bacteremia and

Streptococcus bovis bacteremia: a prospective 16-year study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. April 2005;24(4):250–5.

211. Verhagen DWM, Vedder AC, Speelman P, van der Meer JTM. Antimicrobial treatment of infective endocarditis caused by viridans streptococci highly susceptible to penicillin: historic overview and future considerations. *J Antimicrob Chemother*. 5. Januar 2006;57(5):819–24.
212. Fresenius M, Heck M. *Repetitorium Intensivmedizin: Vorbereitung auf die Prüfung „Intensivmedizin“*. Springer-Verlag; 2007. 539 S.
213. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*. Januar 1992;42(1):166–70.