

Aus der Klinik für Kardiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung eines pulsatilen in vitro – Modells  
der infektiösen Endokarditis als neue Forschungsgrundlage zur  
Evaluation therapeutischer und präventiver Device Coatings

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marc Martinović

aus Berlin

Datum der Promotion: 5. März 2021

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Lauten A, Martinović M, Kursawe L, Kikhney J, Affeld K, Kertzsch U, Falk V, Moter A. Bacterial biofilms in infective endocarditis: an in vitro model to investigate emerging technologies of antimicrobial cardiovascular device coatings. Clin Res Cardiol. 22. Mai 2020. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00392-020-01669-y>

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract .....	2
1. Einleitung: Die infektiöse Endokarditis .....	4
1.1 Epidemiologie .....	4
1.1.1 Risikofaktoren.....	5
1.1.2 Erregerspektrum.....	6
1.2 Pathogenese.....	7
1.2.1 Die infektiöse Endokarditis – eine Biofilm-basierte Erkrankung.....	8
1.3 Klinik.....	12
1.3.1 Verlauf .....	12
1.4 Diagnostik .....	13
1.4.1 Echokardiographie .....	16
1.4.2 Computer- und Magnetresonanztomographie.....	16
1.4.3 Blutkulturen.....	17
1.4.3.1 Blutkultur-negative Patienten.....	17
1.4.4 Erweiterte diagnostische Maßnahmen .....	18
1.4.4.1 Serologische Untersuchung des Blutes .....	18
1.4.4.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	18
1.4.4.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	19
1.5 Therapie.....	19
1.5.1 Antimikrobielle Therapie.....	19
1.5.2 Operative Therapie.....	20
1.6 Modelle zur Forschung an der infektiösen Endokarditis .....	21
1.6.1 In vivo – Modelle .....	21
1.6.2 In vitro – Modelle .....	21
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden .....	23

2.1	Entwicklung des in vitro - Kreislaufmodells.....	23
2.1.1	Anforderungen an das Modell.....	23
2.1.2	Aufbau und Funktion .....	23
2.1.3	Weiterentwicklung des Modells.....	26
2.1.3.1	Steriles Arbeiten.....	26
2.1.3.2	Optimierung der Konstruktion .....	26
2.1.4	Druckmessung .....	29
2.1.5	Sterilitätstests .....	29
2.2	Präparation und Fixation porciner Aortenklappen .....	29
2.3	Annähen der Aortenwurzel an einen passenden Silikonring .....	30
2.4	Waschen porciner Aortenklappen .....	30
2.5	Kultur von <i>Staphylococcus epidermidis</i> PIA 8400 .....	31
2.6	Biofilmerzeugung.....	31
2.6.1	Etablierungsversuche.....	32
2.6.2	Reproduktionsversuche .....	32
2.7	Probenentnahme .....	33
2.8	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	34
2.8.1	Prozessierung der Proben .....	34
2.8.2	Oligonukleotid-Sonden.....	35
2.8.3	Durchführung der FISH.....	36
2.8.4	Mikroskopische Auswertung .....	37
2.9	Real-time PCR.....	37
2.9.1	Isolierung der RNA.....	37
2.9.2	Reverse Transkription .....	37
2.9.3	Durchführung der PCR.....	38
2.9.4	Geldokumentation .....	38
3.	Ergebnisse .....	39
3.1	Klappenfunktion im in vitro – Modell .....	39
3.2	Druckmessung.....	40

3.3	Sterilitätstests .....	41
3.4	Biofilmerzeugung .....	41
3.4.1	Etablierungsversuche .....	42
3.4.2	Reproduktionsversuche .....	44
4.	Diskussion .....	47
4.1	Bedeutung der Ergebnisse .....	47
4.1.1	Strömungsbedingungen .....	47
4.1.2	Mikrobielle Isolation des Modells zur Umgebung .....	48
4.1.3	Biofilmbildung .....	49
4.1.3.1	Etablierungsversuche .....	49
4.1.3.2	Reproduktionsversuche .....	50
4.2	Limitationen .....	51
4.3	Fazit .....	52
4.4	Ausblick .....	52
4.4.1	Evaluation antimikrobiell beschichteter Transkatheterklappen .....	53
5.	Literaturverzeichnis .....	55
6.	Eidesstattliche Versicherung .....	67
7.	Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....	68
8.	Lebenslauf .....	69
9.	Danksagung .....	71

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Illustration der Biofilmbildung an geschädigten Endothelzellen.....	11
Abbildung 2: In vitro - Kreislaufmodell .....	25
Abbildung 3: Konstruktive Weiterentwicklung des Modells .....	28
Abbildung 4: Lokalisationen der Probenentnahme.....	33
Abbildung 5: Trikuspide Klappenfunktion .....	39
Abbildung 6: Druckmessung im aortalen Kompartiment .....	40
Abbildung 7: Makroskopischer Vergleich einer porcinen Aortenklappe vor und nach dem Betrieb im in vitro – Modell .....	41
Abbildung 8: Vergleich der bakteriellen Besiedlung der Etablierungsversuche via FISH .....	43
Abbildung 9: Vergleich der bakteriellen Besiedlung der Semilunartaschen via FISH .....	45
Abbildung 10: Vergleich der bakteriellen Besiedlung der im in vitro – Kreislaufmodell erzeugten Biofilme mit einer klinischen Probe einer humanen IE .....	46
Abbildung 11: Erster Test eines antiinfektiv beschichteten Stents als Pilotprojekt zur Evaluation der Machbarkeit einer antiinfektiv beschichteten Transkatheterklappe zur Therapie der IE.....	54
Tabelle 1: Diagnosestellung einer IE anhand der modifizierten Duke-Kriterien .....	14
Tabelle 2: Haupt- und Nebenkriterien der modifizierten Duke-Kriterien .....	15
Tabelle 3: Übersicht der Versuche zur Biofilmerzeugung .....	33
Tabelle 4: Übersicht der Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Sonden.....	35
Tabelle 5: Übersicht der Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff.....	35

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Die infektiöse Endokarditis (IE) ist trotz Fortschritte der antimikrobiellen und chirurgischen Therapie weiterhin mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. Die IE ist eine Biofilm-basierte, bakterielle Infektion des Endokards, v.a. Aorten- und Mitralklappe werden besiedelt. Die Besiedlung führt oft zu Funktionsstörungen der Herzklappe bis hin zu einer Herzinsuffizienz. Insbesondere für Patienten, die trotz formaler Operationsindikation nicht mit einer Klappenprothese versorgt werden können, werden alternative Therapieverfahren benötigt. Forschungsprojekte in diesem Bereich sind aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit geeigneter Modelle jedoch bisher nur eingeschränkt möglich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein pulsatile in vitro – Modell der infektiösen Endokarditis zu etablieren, in dem unter physiologischen hämodynamischen Bedingungen standardisiert bakterielle Biofilme auf porcinen Aortenwurzeln erzeugt werden. Dieses Modell soll Grundlage für weitere Forschungsvorhaben sein.

**Methoden und Ergebnisse:** Es wurde ein pulsatile Zwei-Kammer-Kreislaufmodell konstruiert, in dem porcine Aortenklappen einer physiologischen Hämodynamik ausgesetzt wurden. In n=3 Sterilitätstests wurde steriles Kulturmedium über 24 h im System bewegt. Das Medium zeigte makroskopisch keine Zeichen mikrobiellen Wachstums und in der Kultur konnte kein Erregerwachstum festgestellt werden.

Es folgten n=4 Etablierungsversuche zur Biofilmerzeugung auf porcinen Aortenklappen mit *Staphylococcus epidermidis* PIA 8400 unter steigender Zeitdauer (24 h, 40 h) und Inokulum ( $1,5 \times 10^4$  CFU/ml,  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml) bei einem Herzminutenvolumen von 5 l. Anschließend wurden n=3 Versuche zur Reproduktion der Biofilme mit gleicher Versuchsdauer (24 h) und Inokulum ( $1,5 \times 10^5$  CFU/ml) durchgeführt. Nach den Versuchen wurden Gewebeschnitte der Aortenwurzeln mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf bakterielle Biofilme untersucht. Die spezifische Erregerbestätigung erfolgte mittels FISH, Kultur und 16S rRNA-PCR mit Sequenzierung.

Die n=4 Etablierungsversuche zeigten eine kokkoide Monospezies-Besiedlung der Herzklappen, deren Intensität zeit- und inokulumabhängig anstieg. Die n=3 Reproduktionsversuche zeigten Biofilme mit aktiven Kokken und einem Besiedlungsmuster vergleichbar mit dem einer humanen IE, wie sie mit der FISH nach einer Infektion mit *S. epidermidis* beobachtet wurde.

**Diskussion:** Es wurde erstmalig ein pulsatile in vitro – Modell der infektiösen Endokarditis etabliert, mit dem in vitro das Wachstum bakterieller Biofilme von ausgewählten Mikroorganismen auf porcinen Aortenwurzeln in toto möglich ist und das darüber hinaus das

Besiedlungsmuster einer humanen IE simuliert. Das Modell soll als Grundlage dienen, um neue Therapieoptionen der IE zu evaluieren, z.B. eine perkutan implantierbare, antiinfektive Transkatheterklappe. Auch die Evaluation von antimikrobiellen Beschichtungen auf Klappenprothesen zur Infektionsprävention ist möglich und das System kann neue Einblicke in die Pathogenese der IE gewähren, z.B. über die Lokalisation von Prädilektionsstellen der bakteriellen Adhäsion an der Klappe und des Biofilmwachstums.

## Abstract

**Objective:** In spite of the progress in antimicrobial and surgical therapy, infective endocarditis (IE) is still associated with a high morbidity and mortality. IE is characterized by bacterial biofilms of the endocardium, especially of the aortic and mitral valve leading to destruction of the valve. Current research demonstrates that about one quarter of the patients with formal surgery indication cannot undergo surgery. This group of patients needs further options of therapy, but due to a lack of models for IE prospects of research are low.

Therefore, the purpose of this project was to establish an in vitro – model of infective endocarditis to allow growth of bacterial biofilms on porcine aortic valves, serving as baseline for further research.

**Methods and Results:** A pulsatile two-chamber circulation model was constructed that kept porcine aortic valves under sterile, physiologic hemodynamic and temperature conditions. To exclude external contamination, sterility tests (n=3) with sterile culture media were performed for 24 h. No growth of microorganisms was observed in the system and cultures after plating on standard media remained negative.

To create biofilms on aortic valves the system was inoculated with *Staphylococcus epidermidis* PIA 8400. Porcine aortic roots were incubated in this system for increasing periods of time (24 h, 40 h) and bacterial titration ( $1,5 \times 10^4$  CFU/ml,  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml) with 5 l cardiac output per minute. After incubation, specimens were embedded and tissue sections were analyzed by Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct pathogen detection and visualization of the biofilms. Monospecies colonization was confirmed by FISH, culture and 16S rRNA-PCR with sequencing. To demonstrate reproducibility of created biofilms further trials with same duration and titration were performed.

The first tests for biofilm growth showed monospecies colonization consisting of cocci with time- and inocula- dependent increasing after 24 h and 40 h (n=4). In n=3 experiments for 24 h with same inocula FISH visualized biofilms with ribosome-containing, and thus active cocci, tissue infiltration and similar colonization pattern as observed by FISH in human IE heart valves infected by *S. epidermidis*.

**Conclusion:** These results demonstrate the establishment of a novel in vitro – model for bacterial biofilm growth on porcine aortic roots and furthermore simulating human IE colonization pattern. The model will allow to identify predilection sites of valves for bacterial adhesion and biofilm growth and it may serve as baseline for further research on IE therapy and prevention, e.g. the development of antimicrobial transcatheter approaches to IE. (1, 2)

# 1. Einleitung: Die infektiöse Endokarditis

Der Begriff „Endokarditis“ (griechisch „endon“ – innen, „kardia“ – Herz) beschreibt zunächst entsprechend seiner Wortherkunft eine Entzündung der innersten Herzhaut, dem Endokard. Das Endokard kleidet alle Herzhöhlen luminal aus und hat einen Schichtaufbau. Die luminalste Schicht ist ein einschichtiges, flaches Plattenepithel, das Endothel. Die weiteren Schichten bestehen aus kollagenen und elastischen Fasern und glatten Muskelzellen. Blut-, Lymphgefäße und Nervenfasern des Erregungsleitungssystems befinden sich hauptsächlich in der nächsttieferen Schicht basal des Endokards, der Tela subendocardialis. (3, 4) Die 4 Herzklappen entstehen während der Herzentwicklung aus dem Endokard. (5) Die Semilunarklappen bestehen ausschließlich aus Endothel und Bindegewebe und sind gefäßfrei, während die Atrioventrikularklappen an ihrer Basis auch Anteile von Herzmuskelfasern mit kleinen begleitenden Gefäßen besitzen. (3, 6, 7) Die nutritive Versorgung der avaskulären Herzklappenbereiche erfolgt demzufolge vorwiegend über Diffusion. (8)

Die nähere Bezeichnung einer Endokarditis erfolgt gemäß ihrer Ätiologie. Es werden Endokarditiden mit einer nichtinfektiösen, rheumatisch-entzündlichen Ätiologie von denen mit einer infektiösen Ätiologie, der sogenannten infektiösen Endokarditis (IE), unterschieden. Die IE ist eine Infektionserkrankung, bei der das Endokard bzw. zugehörige Strukturen (z.B. die Herzklappen) mikrobiell besiedelt werden. Infolge der Infektion kommt es zur namensgebenden Entzündung des Endokards. Die verantwortlichen Erreger sind sehr häufig Bakterien, selten sind es Pilze. Damit die Erreger das Endokard besiedeln können, müssen sie in den Blutstrom gelangen, d.h. Ausgangspunkt für eine IE ist meistens eine Bakteriämie. (3, 9)

## 1.1 Epidemiologie

Die infektiöse Endokarditis ist mit einer Inzidenz von 1,7 - 11,6 / 100.000 / Jahr zwar eine vergleichsweise seltene Erkrankung, mit einer Mortalität von 20 bis 25% hat sie jedoch häufig einen letalen Verlauf. (10, 11) Trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie bleibt die Mortalität der IE seit Jahrzehnten auf diesem hohen Niveau. (12-14) Die mikrobielle Besiedlung im Rahmen einer IE betrifft vor allem die Mitralklappe (41%) und Aortenklappe (38%). Eine Besiedlung der Trikuspidalklappe wurde in 12%, eine Besiedlung der Pulmonalklappe in 1% der Fälle beobachtet. Im Verlauf kommt es häufig zu einer Funktionsstörung der infizierten Herzklappe und zu Komplikationen wie Embolien, Sepsis und Herzinsuffizienz. (15) Die Klappen des linken Herzens werden wesentlich häufiger besiedelt als die Klappen des rechten Herzens, da neben Faktoren, die das Auftreten einer Bakteriämie begünstigen, das Vorhandensein einer strukturellen Herzklappenerkrankung bzw. –Schädigung der wichtigste Risikofaktor für die

Manifestation einer IE ist. (15, 16) Die Klappen des linken Herzens sind häufiger strukturell geschädigt als die des rechten, da sie aufgrund der Druckbelastung einer höheren mechanischen Belastung ausgesetzt sind. (9)

Im Vergleich zur nahezu unveränderten Mortalität haben sich andere Parameter der Epidemiologie innerhalb der letzten Jahrzehnte verändert. Früher war die IE eine Erkrankung von jüngeren Menschen, die meisten erkrankten im Alter von 30 bis 60 Jahren. (17) Heute ist die infektiöse Endokarditis in Industrieländern eine Erkrankung der älteren Bevölkerung. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankungen liegt bei über 80 Jahren. (18) Das Krankheitsbild hat zudem deutlich an Komplexität gewonnen. (12, 13, 18) Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen. (15, 18)

### **1.1.1 Risikofaktoren**

Das vermeintliche Paradox, dass trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie die Inzidenz und Mortalität der IE unverändert geblieben sind, ist in dem Wandel der Epidemiologie begründet – insbesondere im höheren Lebensalter der Patienten. Mitte des 20. Jahrhunderts war der häufigste prädisponierende Faktor eine erworbene Herzklappendestruktion als Residuum eines durchgemachten rheumatischen Fiebers. (17) Heute ist die Inzidenz von Herzklappenschäden durch rheumatisches Fieber in den Industriestaaten dank der flächendeckenden Verfügbarkeit einer Penicillintherapie sehr selten. (9, 12) Bei weniger als 5% der IE-Patienten in Industriestaaten ist die Manifestation der IE mit rheumatischem Fieber assoziiert, während es in Entwicklungsländern weiterhin der häufigste Risikofaktor ist. (15, 19) Das höhere Lebensalter führt dagegen zur Zunahme von altersbedingten strukturellen Herzklappenerkrankungen. In einer großen, prospektiven Studie wurde gezeigt, dass sich die IE in 43% der Fälle auf dem Boden einer degenerativen Mitralinsuffizienz entwickelt, in 26% auf dem einer Aorteninsuffizienz. Auch der Anteil von angeborenen Herzfehlern (12%) ist von Relevanz. (15)

Das höhere Lebensalter erweitert das Spektrum an Risikofaktoren noch weiter. Die Häufigkeit und Dauer von stationären Krankenhausaufenthalten und die Zahl der invasiven Eingriffe, die eine Bakteriämie und folglich eine IE verursachen können, hat sich erhöht. Zusammengefasst wird diese Risikogruppe unter dem Begriff „healthcare-associated infective endocarditis“ (HAIE). (18, 20) Entsprechend haben 27% der Patienten einen invasiven Eingriff vor dem Auftreten der IE. Eine Bakteriämie kann auch bereits durch banal erscheinende Eingriffe ausgelöst werden. In 9% der Fälle wird ein intravenöser Katheter als Risikofaktor identifiziert. (15, 21) Patienten mit HAIE haben außerdem eine im Vergleich ungünstigere Prognose. (18) Da vor allem Verletzungen von Schleimhäuten den Übertritt von Mikroorganismen in den Blutstrom begünstigen, kommt es auch im Rahmen von dentalen Eingriffen zu einer Bakteriämie und

bereits Mikrotraumata, denen der menschliche Organismus im normalen Lebensalltag z.B. durch einfaches Zähneputzen ausgesetzt ist, können zu einer messbaren Bakteriämie führen. (22-24) Es wurde allerdings gezeigt, dass von Zahnbehandlungen kein hohes Risikopotenzial ausgeht, wenn keine weiteren Risikofaktoren vorliegen. (25) Entsprechend wurden die Leitlinien zur Endokarditisprophylaxe nach dentalen Eingriffen angepasst. (26, 27)

Im Zuge des höheren Lebensalters und des medizinischen Fortschritts steigt auch die Zahl der implantierten Herzklappenprothesen und kardialen Devices wie Herzschrittmacher und Kardioverter-Defibrillator-Systemen. Beides sind Risikofaktoren, die die Manifestation einer IE begünstigen. Rund 21% der Patienten haben eine Prothesen- und 7% eine Device-assoziierte IE. (10, 15, 16, 28) Die Prothesen-IE („prosthetic valve infective endocarditis“, PVIE) hat mit einer Mortalität von über 40% eine besonders ungünstige Prognose. (29) Komorbiditäten wie Diabetes Mellitus (16%) und Hämodialyse (8%) gelten ebenfalls als unabhängige Risikofaktoren. (15, 21)

Eine weitere Risikogruppe sind Patienten, die intravenös Drogen konsumieren. Sie sind für nahezu alle infektiösen Endokarditiden des rechten Herzens verantwortlich. Ca. 10% aller Erkrankten konsumieren intravenös Drogen. (15, 30) Die Inzidenz der IE ist unter diesen Patienten deutlich höher als in der Normalbevölkerung. Sie steigt auf ca. 15 - 2000 / 100.000 / Jahr an. (30) Die Prognose in dieser Patientengruppe ist jedoch günstiger, die Sterblichkeit liegt bei unter 10%. (31, 32) Ein weiterer Risikofaktor, der vor allem in dieser Patientengruppe auftritt, ist HIV. Ein Anteil von 30-70% der intravenösen Drogenkonsumenten mit IE ist HIV-positiv. (32) HIV-Seropositivität allein scheint ebenfalls ein unabhängiger Risikofaktor zu sein. (33)

### **1.1.2 Erregerspektrum**

Verschiedene mikrobielle Erreger können eine IE auslösen. In der großen Mehrzahl der Fälle sind Bakterien (>85%) die Pathogene, selten sind es Pilze (1-2%). (9, 15) Die häufigsten bakteriellen Pathogene sind mit einem Anteil von 80% und mehr grampositive Kokken. (15, 18, 34) Vor allem sind hier Erreger der Gattung Staphylokokken (42%) und Streptokokken (29%) vertreten sowie Enterokokken (10%). Nachgewiesene Infektionen mit Spezies der HACEK-Gruppe (*Haemophilus aphrophilus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* und *Kingella kingae*) sind mit einem Anteil von 2% eher selten. (15) Die von allen Erregern in Europa und Nordamerika häufigste Spezies ist *Staphylococcus aureus* (28-43%), je nach Kontinent variiert das Vorkommen jedoch. In Südamerika sind bspw. Streptokokken der Viridansgruppe mit 26% die häufigste Spezies gefolgt von *S. aureus* mit hier nur 17%. (15)

Der wichtigste Faktor für diese Varianz sind vermutlich regionale Unterschiede in der medizinischen Versorgung. Im Zuge des vermehrten Vorkommens von HAIE's steigt der Anteil der Infektionen mit *S. aureus* insbesondere in Nordamerika. (15, 20, 35) Dies ist insofern problematisch, als dass eine *S. aureus* – IE aufgrund der hohen Virulenz des Erregers häufig eine verschlechterte Prognose hat und deren Therapie durch das Vorhandensein von Resistenzen (z.B. Methicillin-resistenter *S. aureus*, MRSA) häufig erschwert ist. (18, 20, 34, 35) Sein Anteilmaximum erreicht *S. aureus* mit 68% in der Risikogruppe der intravenösen Drogenkonsumenten. (15) Interessanterweise ist die Prognose in dieser Risikogruppe günstiger (s. Kap. 1.1.1), was hier jedoch einen Zusammenhang mehr mit der Lokalisation der IE im rechten Herzen als mit der Erregerspezies vermuten lässt. Der Anteil an Koagulase-negativen Staphylokokken (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*) ist bei Patienten mit einer PVIE oder eines kardialen Devices als Infektionsherd erhöht. (15, 20)

Bei einer weiteren Gruppe von IE – Patienten (10%) kann durch das herkömmliche diagnostische Mittel der Blutkultur kein Erreger nachgewiesen werden. (15) Welche Konsequenzen und Probleme dieser Umstand für Patienten und Therapeuten mit sich bringt wird in Kapitel 1.4.3.1 dieser Arbeit näher beschrieben.

## 1.2 Pathogenese

Der Ausgangspunkt einer infektiösen Endokarditis ist zumeist eine Bakteriämie. (s. Kap. 1.1.2) Das alleinige Vorhandensein pathogener Erreger im Blut reicht jedoch in der Regel zur Entwicklung einer IE nicht aus, die Koinzidenz weiterer Faktoren ist erforderlich. Im Tierversuch ist ein intaktes Endothel gegen die Adhäsion bestimmter Pathogene immun. (36) Das regelmäßige Auftreten transientser Bakteriämien durch Mikrotraumata, z.B. infolge von Zähneputzen (s. Kap. 1.1.1), impliziert in Anbetracht der niedrigen Inzidenz der IE ebenfalls, dass eine Bakteriämie nicht zwangsläufig zu einer IE führt. Folglich ist davon auszugehen, dass die Entwicklung einer IE nur auf dem Boden eines geschädigten Endothels möglich ist, da den pathogenen Erregern erst so die Möglichkeit einer Adhäsion geboten wird. (36, 37) Demzufolge ist die nächste Voraussetzung, dass der Erreger zur Adhäsion am Endokard fähig ist. Entsprechend ist in vitro gezeigt worden, dass die Bakterien, die am häufigsten eine IE verursachen, insbesondere grampositive Kokken, die stärksten Adhäsionseigenschaften besitzen. (38-41) Bei den Pilzen korrelieren die Häufigkeit der Spezies als IE-Auslöser und der Grad ihrer Fähigkeit zur Adhäsion ebenfalls. So adhärirt der unter den Pilzen seltene Erreger

*Candida krusei* in vitro schlecht, während der häufigste Pilzerreger *Candida albicans* gut adhäriert. (41-43)

Die Adhäsion stellt somit den Beginn der mikrobiellen Besiedlung dar. Hierbei sind je nach Art der Endothelschädigung zwei Mechanismen möglich. Bei einer Endothelschädigung in Form einer Endothelverletzung, die zur Expression von subendothelialen Strukturen in das Lumen führt, wird die Gerinnungskaskade aktiviert, sodass aktivierte Thrombozyten unter der Produktion von Fibrin die verletzte Fläche abdecken. Das Ergebnis ist eine zunächst sterile Vegetation. (37, 44) Einerseits am Thrombozyten-Fibrin-Koagel selbst, andererseits durch exprimierte Matrixmoleküle wie Fibronectin oder Laminin oder das Kollagen der Basallamina finden die im Blut zirkulierenden Pathogene halt an der Vegetation und besiedeln sie. (40, 41) Beim zweiten Mechanismus besteht die Endothelschädigung in einer Inflammation des Endothels. Die aktivierten Endothelzellen exprimieren Fibronectin und Prokollagene, sodass die Pathogene direkt an der Endotheloberfläche binden. (45) Den weiteren Verlauf der Infektion bestimmen die Virulenzmerkmale der Pathogene. Der häufigste IE-Erreger, *S. aureus*, hat z.B. die Fähigkeit, in Endothelzellen intrazellulär zu persistieren und durch Sezernierung von Koagulase und Clumping-Faktor seine Adhäsionsfähigkeit zu verstärken. (46, 47) Intrazellulär wirkt *S. aureus* proinflammatorisch auf die Endothelzelle, was zu einer verstärkten Sezernierung der Cytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  führt und die Aggregation weiterer Thrombozyten und damit das Wachstum der Vegetation fördert. (48) Nach erfolgreicher Adhäsion folgt die Proliferation der Pathogene. Im Verlauf der Infektion kommt es zu einem weiteren Wachstum der infizierten Vegetation nach dem beschriebenen Muster der Fibrinbildung und Thrombozytenaggregation mit folgender Erregerproliferation. (36, 37, 49)

Die mikrobielle Besiedlung des Endokards in Form einer Vegetation ist eines der wichtigsten Kriterien, die eine IE determinieren und zur Diagnosesicherung einer IE führen. (50) Am häufigsten sind die Vegetationen an den Segeln bzw. Taschen der Herzklappen lokalisiert. (51) Die wachsende Vegetation führt oft zu Funktionsstörungen der besiedelten Herzklappe bis hin zu ihrer Zerstörung. Vegetationen können eine Größe von über 4 cm erreichen. (51)

### **1.2.1 Die infektiöse Endokarditis – eine Biofilm-basierte Erkrankung**

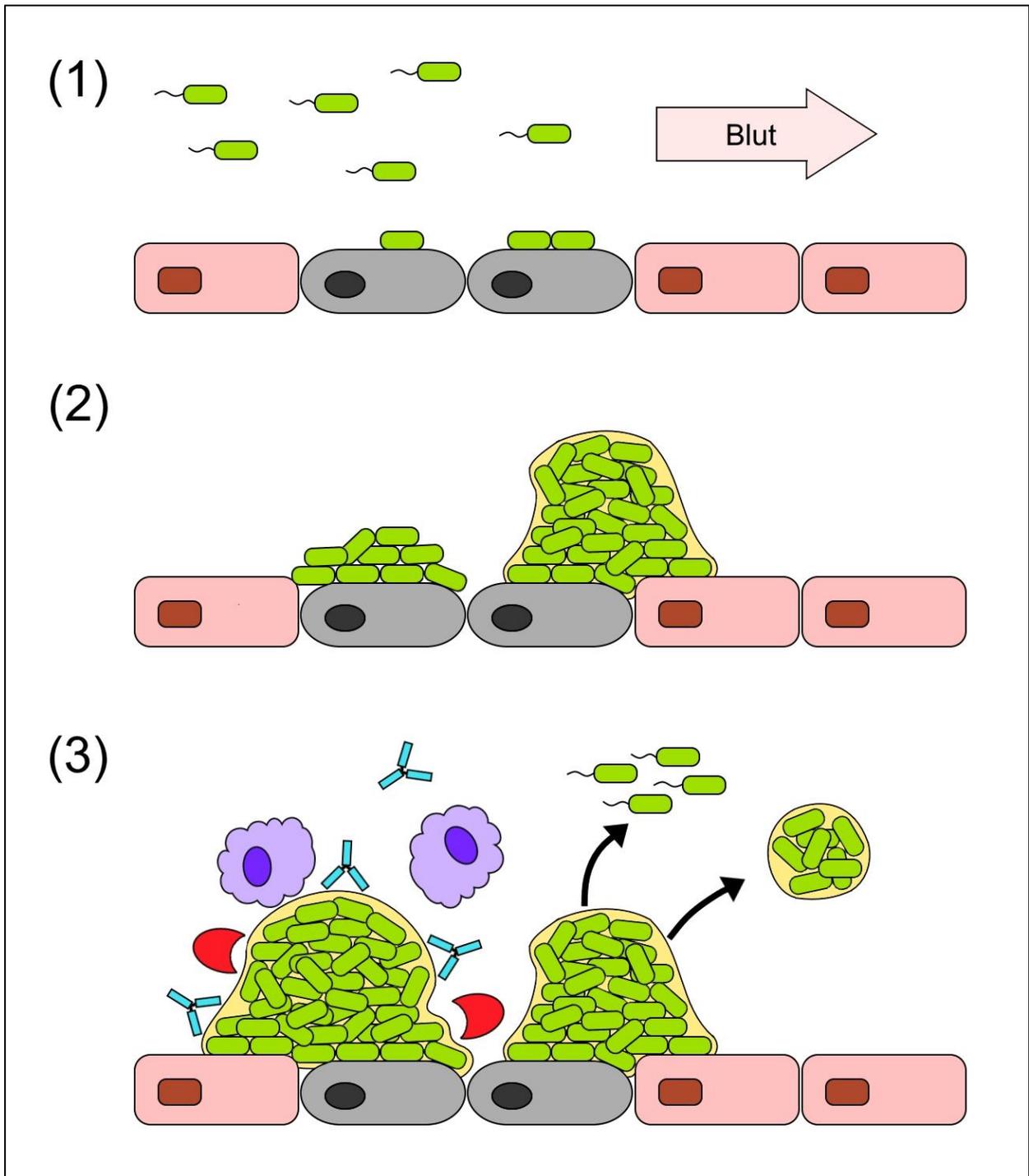
Aktuelle Erkenntnisse lassen mit Evidenz vermuten, dass die Vegetationen mehr als nur einfache Bakterienkolonien sind – nämlich Biofilme. (Abb. 1) (52, 53) Ein Biofilm ist eine komplexe, Oberflächen-assoziierte Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen, in denen die Bakterien aktiv eine Architektur herstellen, die ihnen Evasion und Schutz vor dem Immunsystem bietet. Nach erfolgreicher Adhäsion und erster Proliferation synthetisieren und sezernieren die Bakterien Polymere, durch welche sie sich eine eigene extrazelluläre Matrix

schaffen („extracellular polymeric substances“, EPS). (52, 54, 55) EPS können aus Polysacchariden, Proteinen, extrazellulärer DNA und Lipiden bestehen, wobei ihre Zusammensetzung je nach Erreger und Umweltbedingungen variiert. (53-55) Die EPS machen einen Volumenanteil von ca. 85% im Biofilm aus, während die Bakterien nur einen Volumenanteil von ca. 15% ausmachen. (55) Da die EPS zu einem großen Anteil Wasser binden, erhält der Biofilm eine schleimartige Konsistenz und schafft eine räumliche Trennung zwischen Oberfläche und Bakterien. Die so im Biofilm eingebetteten Bakterien haben nicht nur eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Immunsystem, sondern auch gegen antimikrobielle Wirkstoffe, was die erfolgreiche Therapie von Biofilm-basierten Infektionen zu einer Herausforderung macht. (52, 54, 55) Innerhalb eines Biofilms lassen sich außerdem Zellen in verschiedenen Stoffwechszuständen voneinander unterscheiden. Die meisten Bakterien besitzen einen „normalen“, d.h. aktiven Stoffwechsel. Einige wenige – v.a. im tieferen Biofilm lokalisiert – befinden sich jedoch in einem Ruhezustand. Diese Bakterien haben eine außergewöhnlich hohe Widerstandsfähigkeit gegen Antibiotika. Entsprechend dieser Eigenschaft werden sie „persister cells“ (Persisterzellen) genannt. Eine Eradikation der Persisterzellen durch Antibiotika kann besonders herausfordernd bis unmöglich sein. (56) Welche der beiden Mechanismen – räumliche Trennung durch EPS oder stark erhöhte Toleranz der Persisterzellen – letzten Endes mit welchem Anteil zur erhöhten Widerstandsfähigkeit von Biofilmen beitragen, ist noch nicht abschließend geklärt. (56) Um ausgehend von ersten adhätierenden Bakterien über eine Mikrokolonie zu einem reifen Biofilm samt seiner komplexen Architektur zu wachsen, ist eine Kommunikation zwischen den Bakterien notwendig, das sogenannte Quorum Sensing. Quorum Sensing ist eine Zell-Zell-Kommunikation über bakterielle Signalmoleküle, die in Abhängigkeit von der bakteriellen Dichte sezerniert werden. (52, 54, 55) Über das Quorum Sensing regulieren die Bakterien ihre Genexpression so, dass der Biofilm gegenüber den Anforderungen der Umwelt möglichst gut aufgestellt ist. Dies beinhaltet nicht nur die Regulation der Proliferation und Anordnung der Bakterien innerhalb des Biofilms, sondern auch die Regulation der Sezernierung von EPS und Virulenzfaktoren, der Genexpression für erhöhte Antibiotikatoleranz und vermutlich auch der Steuerung des Ruhezustands. (52, 54-56) Über Quorum Sensing wird vermutlich außerdem die Fähigkeit von Bakterien gesteuert, den Biofilm als planktonisches Bakterium aktiv zu verlassen. (52, 57) Über diesen Mechanismus ist eine Dissemination der Pathogene in angrenzende Areale oder andere Organe möglich. (52, 54) Davon zu unterscheiden ist die Dissemination durch Abscherung von ganzen Anteilen des Biofilms, welche durch Schubspannung einer den Biofilm umgebenden Strömung ausgelöst werden kann. (52, 54) Biofilm-assoziierte Infektionserkrankungen sind z.B. Karies, Parodontitis, chronische Otitis media, Osteomyelitis, die chronische bakterielle Prostatitis und die Pneumonie bei einer bestehenden Cystischen Fibrose. (52, 55)

Bereits 1999 vermuteten Costerton et al., dass die IE eine Biofilm-assoziierte Infektion ist. (52) Aktuell wird dieser Umstand weiterhin diskutiert. (53) Die PVIE ist als Fremdkörper-assoziierte Infektion klar einer Biofilm-assoziierten Pathogenese zuzuordnen. (58) Auch die Nativklappen-IE („native valve IE“, NVIE) weist entscheidende Merkmale auf, anhand derer sie als Biofilm-assoziiert einzuordnen ist. Parsek und Singh formulierten folgende Merkmale zur Einordnung einer Erkrankung als Biofilm-assoziiert:

*„(a) The infecting bacteria are adherent to some substratum or are surface associated. (b) Direct examination of infected tissue shows bacteria living in cell clusters, or microcolonies, encased in an extracellular matrix. The matrix may often be composed of bacterial and host components. (c) The infection is generally confined to a particular location. Although dissemination may occur, it is a secondary phenomenon. (d) The infection is difficult or impossible to eradicate with antibiotics despite the fact that the responsible organisms are susceptible to killing in the planktonic state.“ (59)*

Bei einer NVIE sind die Bakterien lumenseitig am Endothel und Thrombozyten-Fibrin-Koagel adhären. (36, 37, 41, 49) Elektronenmikroskopisch wurde die typische Architektur bakterieller Biofilme in Vegetationen gezeigt. Zusätzlich zu den Thrombozyten und dem Fibrin des Wirts enthalten die Vegetationen von den Bakterien sezernierte EPS. (54, 55, 60, 61) Die Merkmale (a) und (b) sind damit erfüllt. Die Erreger der IE – insbesondere die häufigen grampositiven Kokken – sind außerdem bekannte Biofilmbildner. (52, 54, 58) Wie in (c) beschrieben, findet bei der IE Dissemination zwar sowohl in Form von planktonischen Bakterien statt, was als Komplikation rekurrente Bakteriämien und Sepsis zur Folge haben kann, als auch durch Abscherung größerer Biofilmteile, was zu Embolisierungen und auch Infektionsherden in z.B. Niere oder Hirn führen kann. (9, 10, 15, 54) Der Ursprung und der Fokus der IE ist jedoch stets die Vegetation, während die Folgen der Dissemination Komplikationen sind. (10, 16) Merkmal (d) trifft ebenfalls auf die IE zu. Trotz der Gabe systemischer Antibiotika und dadurch zunächst negativer Blutkulturen, erleiden 2 – 6% der Patienten ein Rezidiv erneuter Bakteriämien. (50, 62) Dieser Umstand kann den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen. (63) Weiterhin ist der häufigste Grund für eine Blutkultur-negative IE die vorherige Einnahme von Antibiotika, welche zwar die planktonischen Bakterien im Blut beseitigen jedoch keine vollständige Eradikation der Infektion erreichen. (16, 62, 64, 65) Daher ist bei vielen Patienten – zusätzlich zu der Antibiotikatherapie – die frühzeitige operative Entfernung der erkrankten Herzklappe und die Implantation einer Herzklappenprothese die wichtige, die Prognose entscheidend verbessernde Therapieoption. (62, 66, 67)



**Abbildung 1: Illustration der Biofilmbildung an geschädigten Endothelzellen**

(1): Die bei einer Bakteriämie im Blutstrom zirkulierenden Pathogene adhären am Endothel. Eine Schädigung des Endothels, z.B. infolge einer strukturellen Herzklappenerkrankung, begünstigt die Adhäsion und ist häufig eine Voraussetzung für die Manifestation der Infektion. (15, 16, 52) (2): Es folgt die Proliferation der Bakterien. Aus einer bakteriellen Adhäsion entsteht zunächst eine Mikrokolonie und im weiteren Verlauf ein manifester Biofilm. (52, 54) (3): Der Biofilm weist typische Eigenschaften auf. Die Architektur des Biofilms verleiht den Bakterien Evasion und Schutz vor dem Immunsystem des infizierten Wirts und eine erhöhte Toleranz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Ausgehend vom Biofilm können die Erreger durch das Loslösen planktonischer Bakterien aus dem Biofilm oder unter dem Einfluss der Schubspannung der Blutströmung durch das Lösen ganzer Biofilmanteile in die benachbarte Umgebung oder auch entfernte Organe disseminieren. (51-53)

## 1.3 Klinik

Das häufigste Symptom einer IE ist Fieber. (9, 10, 15, 62) Bis zu 96% der Patienten haben Fieber. (15) Weitere unspezifische, infektionsbedingte Symptome sind Schüttelfrost, Schweißneigung, Schwäche, Erschöpfung, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. (9, 10, 62) Ein spezifischeres, das Herz betreffende Symptom ist das erstmalige Auftreten oder eine akute Änderung von Herzgeräuschen. Viele IE-Patienten haben bereits aufgrund einer prädisponierenden Herzklappenerkrankung vor der Krankheitsmanifestation ein bestehendes Herzgeräusch. (s. Kap. 1.1.1) Entsteht an der erkrankten Herzklappe im Rahmen der IE eine Vegetation, ändert sich das bestehende Herzgeräusch häufig. (9, 10, 62) Bei 20% der Patienten verschlechtert sich ein zuvor bestehendes Herzgeräusch akut, während bedingt durch die Vegetation bei 48% ein neues Herzgeräusch auftritt. (15) 32% der Patienten erleiden im Verlauf eine Herzinsuffizienz und in 14% der Fälle entwickelt sich intrakardialer Abszess. (15)

Durch das Lösen von Vegetationsteilen kommt es zu Embolisationen. (9, 62) 17% erleiden einen Schlaganfall. (15) Infarkte der Milz und der Niere kommen auch vor. (9, 10, 62) Im Rahmen dieser Embolisationen mit infektiösem Material oder auch durch planktonische Bakterien können sich bakterielle Absiedlungen in Hirn, Milz und Niere bilden. Dadurch und/oder Immunkomplex-vermittelt kommt es vor allem zu Glomerulonephritiden. (9, 10, 16, 62) Eine Splenomegalie entwickeln 11%, Abszesse der Milz sind ebenfalls geläufig. (10, 15, 62)

Dermale Symptome umfassen Petechien (30%), Nagelbettblutungen (8%), linsengroße, schmerzhaft, rötliche Knötchen v.a. an Fingern und Zehen (Osler-Knötchen) (3%) und kleine, nicht schmerzhaft Einblutungen an Handinnenflächen und Fußsohlen (Janeway-Läsionen) (5%). (9, 10, 15, 16) Des Weiteren weisen 2% der Patienten retinale Einblutungen (Roth-Flecken) und 5% konjunktivale Blutungen auf. (9, 15)

Im Rahmen der Bakteriämie kann es außerdem zu einer Sepsis kommen. (10, 62) Bis zu 26% der IE-Patienten in intensivmedizinischer Betreuung erleiden einen septischen Schock. (68)

### 1.3.1 Verlauf

Entsprechend der großen Heterogenität der klinischen Manifestationen kann auch der klinische Verlauf einer IE individuell sehr unterschiedlich sein. Es lässt sich eine Endokarditis acuta von einer Endokarditis lenta abgrenzen. Die Endokarditis acuta hat einen akuten bis hochakuten Verlauf, der häufig komplikationsbehaftet und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Sie wird durch hochvirulente Erreger wie z.B. Staphylokokken ausgelöst und erfordert ein besonders schnelles therapeutisches Handeln. Die Endokarditis lenta dagegen hat einen

langsameren, komplikationsloseren Verlauf. Häufig entwickelt sich zunächst ein Fieber unklarer Genese und im weiteren Verlauf entsteht eine schleichende Herzinsuffizienz. Der häufigste Erreger dieser Verlaufsform sind Streptokokken der Viridansgruppe. (9)

## **1.4 Diagnostik**

Auch zur Diagnostizierung einer IE ist der erste Schritt eine gründliche Anamnese und körperliche Untersuchung des Patienten. Das Auftreten der vielen verschiedenen Symptome kann von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sein. (s. Kap. 1.3) Neben der Erhebung von Risikofaktoren und klinischen Befunden sind daher in der Regel weitere Untersuchungen wie eine Echokardiographie und die Gewinnung von Blutkulturen notwendig. Um die klinische Diagnosesicherung der IE zu strukturieren und zu verbessern, wurde ein Katalog standardisierter Kriterien entwickelt, die sogenannten Duke-Kriterien. Erstmals veröffentlicht wurden sie 1994. Sie erreichten eine beachtliche Steigerung der klinischen Diagnoserate von 51% auf 80%. (69) Eine überlegene Sensitivität (>80%) bei gleichbleibend hoher Spezifität (>90%) wurde im Vergleich zu vorherigen Kriterien bestätigt. (70-73) Dennoch wurden die Duke-Kriterien im Jahr 2000 von Li et al. modifiziert. (Tab. 1, Tab. 2) (74) Die modifizierten Duke-Kriterien sind Bestandteil der aktuellen Guidelines zum Management der IE der American Heart Association (AHA) und der European Society of Cardiology (ESC). (50, 62) Die Kriterien sind als hilfreicher Leitfaden zur Diagnosestellung einer IE anzusehen, sie ersetzen jedoch nicht das klinische Urteilsvermögen des behandelnden Ärzteteams für jeden individuellen Patientenfall. (50, 62, 74)

Definitive IE
<u>Pathologische Kriterien</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Erregernachweis durch Kultur oder histologische Untersuchung einer Vegetation, einer embolisierten Vegetation oder eines intrakardialen Abszess; oder</li> <li>b. Nachweis pathologischer Läsionen; Nachweis einer Vegetation oder intrakardialen Abszess durch eine histologische Untersuchung mit bestätigter aktiven Endokarditis</li> </ol> <u>Klinische Kriterien*</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>a. 2 Hauptkriterien erfüllt; oder</li> <li>b. 1 Haupt- und 3 Nebenkriterien erfüllt; oder</li> <li>c. 5 Nebenkriterien erfüllt</li> </ol>
Fragliche IE
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 Haupt- und 1 Nebenkriterium erfüllt; oder</li> <li>• 3 Nebenkriterien erfüllt</li> </ul>
Keine IE
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plausible andere Diagnose; oder</li> <li>• Verschwinden der IE-Symptome nach <math>\leq 4</math> Tagen Antibiose; oder</li> <li>• Kein pathologischer Nachweis einer IE nach OP oder Obduktion nach <math>\leq 4</math> Tagen Antibiose; oder</li> <li>• Kriterien einer fraglichen IE werden nicht erfüllt</li> </ul>

**Tabelle 1: Diagnosestellung einer IE anhand der modifizierten Duke-Kriterien**

Anhand der modifizierten Duke-Kriterien lässt sich die Diagnose einer IE in 3 Level einteilen: Definitive IE, fragliche IE und keine IE. Die Einteilung erfolgt anhand pathologischer und klinischer Kriterien. \* s. Tab. 2  
*Adaptiert nach Li et al. (74)*

## Hauptkriterien

### 1.) Positive Blutkulturen

- a. Typische Erreger vereinbar mit einer IE in 2 separaten Blutkulturen:
  1. Streptokokken der Viridansgruppe, *Streptococcus bovis*, Spezies der HACEK-Gruppe, *Staphylococcus aureus*; oder
  2. Community-acquired Enterokokken ohne Primärfokus; oder
- b. Erreger vereinbar mit einer IE in persistierend positiven Blutkulturen:
  - $\geq 2$  positive Blutkulturen mit Entnahmeabstand  $> 12$  h; oder
  - Alle von 3 oder die Mehrheit von  $\geq 4$  separaten Blutkulturen sind positiv (Abstand erste und letzte Entnahme  $\geq 1$  h); oder
- c. 1 positive Blutkultur von *Coxiella burnetii* oder Phase 1 IgG Antikörpertiter  $> 1 : 800$

### 2.) Positive Echokardiographie

(Bei Patienten mit Klappenprothese, als „fragliche IE“ eingestufte IE oder komplizierter IE [paravalvulärer Abszess] TEE empfohlen)

- a. Oszillierende intrakardiale Masse an einer Klappe oder benachbarten Strukturen, im Bereich von Jets (Regurgitation) oder auf implantiertem Material ohne andere anatomische Erklärung
- b. Intrakardialer Abszess
- c. Neue Dehiszenz einer Klappenprothese
- d. Neue Klappeninsuffizienz (Verschlechterung Änderung einer vorbestehenden Insuffizienz ist nicht hinreichend)

## Nebenkriterien

- 1.) Prädisponierende Herzerkrankung, intravenöser Drogenkonsum, andere Risikofaktoren
- 2.) Fieber (Temperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$ )
- 3.) Vaskuläre Befunde, Hauptarterienembolie, septische Lungeninfarkte, mykotisches Aneurysma, intrakranielle Blutung, Janeway-Läsionen
- 4.) Immunologische Zeichen: Glomerulonephritis, Osler-Knötchen, Roth-Flecken, Rheumafaktor
- 5.) Mikrobiologische Zeichen: positive Blutkultur ohne ein Hauptkriterium zu erfüllen\* oder serologischer Nachweis einer aktiven Infektion mit Erregern vereinbar mit einer IE

### **Tabelle 2: Haupt- und Nebenkriterien der modifizierten Duke-Kriterien**

\* ausgenommen ist eine einzelne positive Blutkultur mit Koagulase-negativen Staphylokokken oder einem Erreger unvereinbar mit einer IE. *Adaptiert nach Li et al. (74)*

### **1.4.1 Echokardiographie**

Die Echokardiographie ist ein zentrales Diagnostikum, eines der beiden Hauptkriterien der Duke-Kriterien ist ein positiver echokardiographischer Befund. (s. Tab. 1) Aktuelle Leitlinien empfehlen, bei allen Patienten mit dem Verdacht einer IE eine transthorakale Echokardiographie (TTE) durchzuführen. (50, 62) In ca. 60-70% der Fälle können durch eine TTE Vegetationen diagnostiziert werden. (75, 76) Die Sensitivität ist hierbei jedoch von der Größe der Vegetation abhängig. Bei Vegetationen kleiner als 5 mm beträgt die Sensitivität 25%, bei 6-10 mm 70% und bei mehr als 11 mm 100%. (76) Die Sensitivität der TTE für die Detektion von kardialen Abszessen beträgt 28%. (77) Die transösophageale Echokardiographie (TEE) ist der TTE hierbei überlegen. Bei der Detektion von Vegetationen und kardialen Abszessen hat die TEE eine Sensitivität von ca. 90%. (75-77) Daher empfiehlt die ESC bei negativer TTE und bestehendem klinischen Verdacht sowie bei Patienten mit Herzklappenprothese oder intrakardialem Device zusätzlich eine TEE durchzuführen. Selbst bei positiver TTE soll eine TEE erwogen werden, es sei denn es handelt sich um eine Rechtsherz-NVIE mit guten Schallbedingungen und klarem Befund während der TTE. (62) Insbesondere bei schlechten Schallbedingungen der TTE z.B. bei chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung oder Adipositas wird die zügige Durchführung einer TEE empfohlen. (50) Die Dehiszenz einer Klappenprothese, eine neue Klappeninsuffizienz, Klappenperforation oder –Aneurysma sind ebenfalls mit einer TTE oder TEE festzustellen und im genannten Hauptkriterium enthalten. (50, 62) Des Weiteren werden in den aktuellen Leitlinien der AHA und ESC die Vorteile der 3D-TEE diskutiert, die nach derzeitigem Stand vor allem in einer verbesserten Darstellung von Morphologie und Größe der Vegetationen besteht, wodurch sich beispielsweise das von der Vegetation ausgehende Embolierisiko besser abschätzen lässt. (50, 62)

### **1.4.2 Computer- und Magnetresonanztomographie**

Andere bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) erreichen im Zuge des technischen Fortschritts immer bessere Ergebnisse und lassen sich auch im Rahmen der IE anwenden. (62) So wird beispielsweise diskutiert, inwiefern die CT als risikoärmere Alternative zur präoperativen Koronarangiographie bei Patienten mit Aortenklappen-IE dienen kann. (78) Weiterhin zeigt die CT eine mit der TEE vergleichbare Sensitivität und Spezifität bei der Detektion von Vegetationen und zeigt gegenüber der TEE Vorteile bei der Darstellung von Abszessen und Pseudoaneurysmen. (79) Vegetationen, Dysfunktion, Abszesse und Dehiszenz im Rahmen einer PVIE werden durch eine CT ebenfalls mit gleicher Genauigkeit wie mit der TEE erkannt.

(80) Da jedoch großangelegte Studien hierzu fehlen, bleibt das CT zunächst eine zusätzliche Option zur Echokardiographie. (62)

Studien haben gezeigt, dass durch eine MRT in 50-80% der IE-Patienten cerebrale Läsionen gefunden werden. (81, 82) Folglich hat die MRT in der Diagnosestellung der IE ihren größten Nutzen bei Patienten, die eine „fragliche IE“ (s. Tab. 1) ohne neurologische Defizite haben, da der Nachweis einer cerebralen Ischämie ein Nebenkriterium der Duke-Kriterien und diese per MRT am besten zu diagnostizieren ist. (62, 74, 83, 84) Dementsprechend wurde gezeigt, dass bei ca. 25% der IE-Patienten mit einer fraglichen IE durch eine MRT die Diagnose zu einer definitiven IE aufgewertet werden kann. (85) Bei Patienten mit neurologischen Defiziten ist durch die klinische Diagnosestellung einer cerebralen Läsion das entsprechende Nebenkriterium bereits erfüllt, weshalb sich an der Diagnosestellung der IE in Hinblick auf die Duke-Kriterien bei diesen Patienten durch eine MRT nichts ändert. (62, 74, 84)

### **1.4.3 Blutkulturen**

Neben der Echokardiographie ist die Gewinnung von Blutkulturen das zweite zentrale Diagnostikum der IE. (s. Kap. 1.4) Die Entnahme des Blutes soll stets vor dem Beginn einer antibiotischen Therapie stattfinden. (9, 62) Es sollen mindestens 3 Sätze mit jeweils einer aeroben und einer anaeroben Probe im Abstand von jeweils 30 Minuten entnommen werden. Um eine Kontamination zu vermeiden, sollte bei jeder Entnahme auf eine maximal sorgfältige Desinfektion und sterile Handhabung geachtet werden. Hierfür empfiehlt sich die Punktion einer peripheren Vene. Zusätzlich zur Identifikation der Erreger sollte stets ein Antibiogramm der Spezies erstellt werden. Zur Kontrolle des Therapieerfolgs sollte die Entnahme von Blutkulturen in einem Abstand von 48-72 h nach dem Erregernachweis wiederholt werden. In vielen Fällen lassen sich durch eine Blutkultur so die auslösenden Erreger der IE identifizieren. (62)

#### **1.4.3.1 Blutkultur-negative Patienten**

Bei rund 10% der Patienten mit einer IE kann durch die Entnahme von Blutkulturen jedoch kein Erreger nachgewiesen werden. (15) Diese Form der IE wird Blutkultur-negative IE (BKNIE) genannt und macht eine korrekte Diagnose und Therapie besonders herausfordernd. Es besteht die Gefahr für den Patienten, undiagnostiziert zu bleiben und keine erregerspezifische Therapie zu erhalten. (50, 62) Die häufigste Ursache einer BKNIE ist eine antibiotische Therapie vor Entnahme der Blutkulturen. (64, 65, 86) Diesem Umstand kann durch einen späteren Beginn der antibiotischen Therapie begegnet werden, wenn der klinische Zustand des

Patienten dies zulässt. (64) Bei den übrigen Patienten mit BKNIE liegt die Ursache daran, dass die verursachenden Erreger nur langsam wachsen und nur unter anspruchsvollen, vom Standard abweichenden Umgebungen kultivierbar sind. Dazu gehören z.B. *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp., *Bartonella* spp., *Abiotrophia* spp., *Listeria monocytogenes*, *Legionella* spp., *Tropheryma whipplei*, *Mycoplasma hominis*, *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. (62, 65, 86, 87) Folglich ist bei einer BKNIE eine erweiterte Diagnostik zur Erregeridentifikation ratsam. (50, 62)

#### **1.4.4 Erweiterte diagnostische Maßnahmen**

##### **1.4.4.1 Serologische Untersuchung des Blutes**

Durch eine systematische Blutserologie kann in ca. 50-60% der Fälle mit BKNIE ein Erregernachweis erzielt werden. Die hierbei nachgewiesenen Erreger sind mit großer Mehrheit *Coxiella burnetii* oder *Bartonella* spp. und selten *Legionella* spp., *Mycoplasma hominis* oder *Aspergillus* spp. (86-88) Dementsprechend wird von der ESC vorgeschlagen, im Falle einer BKNIE in Abhängigkeit von ihrem regionalen Vorkommen eine systematische Serologie der Erreger *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Brucella* spp., *Legionella pneumophila* und *Aspergillus* spp. durchzuführen. (62) In den modifizierten Duke-Kriterien ist die Serologie von *Coxiella burnetii* bereits Bestandteil eines Hauptkriteriums. (74)

##### **1.4.4.2 Polymerase-Kettenreaktion**

Ein weiteres diagnostisches Mittel zur Erregeridentifikation ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Das häufigste Zielgen, das bei der PCR amplifiziert und somit als positiver Erregernachweis gewertet wird, ist die bakterielle, ribosomale 16S rRNA. (89) Eine PCR aus Blut zeigt bisher nur eine geringe Sensitivität von ca. 14%, kann aber bei einem geringen Anteil von Patienten mit einer BKNIE zu einem Nachweis von schwer zu kultivierenden Erregern führen. (88, 90) Daher soll eine PCR aus Blut bei BKNIE einerseits nach positiver Serologie bei bestimmten Erregern als spezifische Bestätigung des Erregers und andererseits als Screening-Methode auf bestimmte Erreger bei negativer Serologie in Erwägung gezogen werden. (62) Relevanz hat dies vor allem bei Patienten, bei denen kein Biopsiematerial zur Verfügung steht. (90) Bei der pathologischen Analyse von Herzklappenmaterial erweist sich die PCR bereits als sinnvolles Diagnostikum zusätzlich zu Histologie und Kultur und wird von der ESC empfohlen, um schwer kultivierbare Erreger aus Biopsiematerial nachzuweisen. (62, 86, 88) So wurde in einer Übersichtsarbeit von Moter et al. gezeigt, dass eine PCR von Biopsiematerial in 42% der Fälle einer BKNIE zu einem Erregernachweis führt. (91) Dennoch wird darauf hingewiesen,

dass für die standardisierte Durchführung von PCR-Diagnostik spezialisierte Laboratorien erforderlich sind und die Interpretation der Ergebnisse eine genaue Kenntnis der Methodik erfordert, da z.B. DNA-Kontaminationen anderer Erreger auftreten können und die PCR keine Aussage bzgl. Vitalität der Erreger macht. (86, 89, 91)

#### **1.4.4.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist ein Mikroskopieverfahren, bei dem Fluoreszenz-markierte Sonden an eine Zielstruktur der Erreger binden und diese so unter dem Mikroskop direkt visualisiert werden können. (92, 93) Bei Bakterien ist hier wie bei der PCR die 16S rRNA häufig die markierte Zielstruktur. (92) Im Falle der IE kann die FISH zur Analyse von Biopsiematerial verwendet werden. Die FISH vereint somit pathologische, mikrobiologische und molekulargenetische Methoden. Sie hat vor allem den Vorteil, dass sie morphologisch intakte Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung darstellt. Durch die direkte, räumliche Darstellung bietet die FISH großes Potenzial in der Erforschung von Biofilmen. (91, 92) Anhand der Markierung der 16S rRNA und der damit verbundenen Proteinbiosynthese lässt sich mit FISH ferner auf die Stoffwechselaktivität der dargestellten Mikroorganismen rückschließen. (94) In der Diagnostik der IE ist die FISH jedoch kein Standardverfahren sondern hat bisher einen experimentellen Charakter. In den aktuellen Leitlinien der AHA und ESC wird die FISH nicht erwähnt. (50, 62) In einer Pilotstudie, in der 54 resezierte Herzklappen mit FISH untersucht wurden, zeigt sich, dass durch FISH in ca. 40% der BKNIE und in ca. 30% der Kultur-negativen Herzklappenbiopsien ein verursachendes Pathogen identifiziert werden kann. (95)

### **1.5 Therapie**

Da die IE eine komplexe Erkrankung ist, empfiehlt sich zur Abstimmung der optimalen Therapie ein spezialisiertes, interdisziplinäres Team aus Kardiologen, Herzchirurgen, Mikrobiologen und Infektiologen. (9, 62) Die therapeutische Basis der IE ist die Applikation von antimikrobiellen Wirkstoffen mit dem Ziel einer Eradikation der Infektion, im Falle von Komplikationen oder Persistenz der Infektion werden zusätzlich herzchirurgische Maßnahmen notwendig. (62)

#### **1.5.1 Antimikrobielle Therapie**

Eine systemische, antimikrobielle Therapie ist bei einer IE obligat. Nach der Entnahme der Blutkulturen wird eine initiale, empirisch kalkulierte Therapie empfohlen, insbesondere bei

Patienten mit akuter Klinik. Entsprechend der aktuellen Leitlinien der ESC von 2015 ist dazu zunächst die Kenntnis über eine vorherige antibiotische Therapie notwendig und darüber, ob eine Nativklappe oder eine Klappenprothese betroffen ist und wenn ja, wann diese implantiert wurde und wo die Infektion vermutlich stattgefunden hat, d.h. ob sie ambulant, nosokomial, oder nicht nosokomial in der medizinischen Versorgung erworben wurde. Dementsprechend wird die initiale, kalkulierte Therapie in zwei Gruppen unterteilt. Eine ambulant erworbene NVIE oder eine späte PVIE ( $\geq 12$  Monate postoperativ) soll initial mit Ampicillin, Cloxacillin oder Oxacillin und Gentamicin, bei Penicillinallergie mit Vancomycin und Gentamicin therapiert werden. Im Falle einer frühen PVIE ( $< 12$  Monate postoperativ), nosokomial erworbener oder nicht nosokomialer HAIE wird die Kombination aus Vancomycin, Gentamicin und Rifampin empfohlen. Genaue Angaben zu Dosierung, Art der Applikation und weiteren Hinweisen können den Leitlinien der ESC entnommen werden. (62)

Nach der Identifikation des verursachenden Erregers soll die Therapie auf die Erregerspezies und deren Antibiogramm angepasst werden. Hierfür werden von der ESC je nach Spezies und Resistenz differenzierte Empfehlungen bereitgestellt. (62)

### **1.5.2 Operative Therapie**

Da es im Verlauf einer IE häufig zu Komplikationen kommt, wird bei ca. 50% der Patienten zusätzlich zur systemischen Antibiose eine operative Therapie durchgeführt. (96) Indikationen für eine dringende Operation sind schwere Funktionsstörungen der Aorten- oder Mitralklappe, Herzinsuffizienz, intrakardialer Abszess, Pseudoaneurysma, Infektion mit Pilzen oder multiresistenten Erregern und persistierend positive Blutkulturen trotz angemessener antibiotischer Therapie. (62) Außerdem kann eine Operation ab einer Vegetationsgröße von  $> 10$  mm protektiv vor Embolien sein und wird daher unter bestimmten Voraussetzungen empfohlen. (62) Das operative Vorgehen hat zum Ziel, infiziertes Gewebe vollständig zu entfernen und anschließend, wenn nötig, wieder eine funktionsfähige Morphologie der beteiligten Strukturen herzustellen. Letzteres ist durch die Implantation einer Klappenprothese oder durch die Reparatur der geschädigten Klappe möglich. Im Falle eines Befalls der Mitralklappe oder Trikuspidalklappe wird wenn möglich die Reparatur der Klappe favorisiert. (62, 97, 98) Bei einem Befall der Aortenklappe ist die Implantation einer Prothese oder Spenderklappe das Mittel der Wahl. (62) Es wird außerdem von Fällen mit extremen perivalvulären Schäden und Herzversagen berichtet, in denen als ultima ratio erfolgreich eine Herztransplantation durchgeführt wurde. (99)

Für viele Patienten ist die chirurgische Sanierung und die anschließende Klappenreparatur bzw. Implantation einer Klappenprothese folglich die wichtige, die Prognose entscheidend verbessernde Therapieoption. (34, 62, 66) Vor allem eine frühzeitige chirurgische Intervention wirkt sich hier günstig aus. (50, 62, 67)

## **1.6 Modelle zur Forschung an der infektiösen Endokarditis**

Traditionell ist die IE eine Erkrankung mit einer hohen Morbidität und Mortalität. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden erste experimentelle Modelle zur Erforschung der Pathogenese und Therapie der IE entwickelt. (100, 101) Aktuell stehen sowohl in vivo – Modelle als auch eine begrenzte Auswahl an in vitro – Modellen zur Verfügung.

### **1.6.1 In vivo – Modelle**

Experimentelle in vivo – Modelle der IE, insbesondere anhand von Hasen, sind seit Jahrzehnten etabliert. (36, 37, 41) Auch aktuell werden leporine in vivo – Modelle zur Forschung an der IE genutzt und stetig weiterentwickelt. (102) Im Vergleich zeigt sich jedoch, dass in vivo- gegenüber in vitro – Modellen einige Nachteile haben. In vivo – Modelle sind sehr kosten- und arbeitsintensiv, schwer zu standardisieren und ethisch problematisch. (103) Häufig, insbesondere unter der Verwendung von Hasen oder kleineren Tieren, sind in vivo – Modelle des Weiteren anatomisch nicht passend für die Erforschung humaner kardiovaskulärer Implantate oder Devices. Bei der Verwendung hierfür passenderer Tiermodelle, z.B. porcine oder bovine Modelle, ist der Kosten- und Arbeitsaufwand ungleich höher.

### **1.6.2 In vitro – Modelle**

Für Forschungsvorhaben anhand von in vitro – Modellen der IE ist bisher nur eine begrenzte Auswahl an Modellen verfügbar. Zur Erforschung der bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung sind in vitro – Modelle in Form von Mikrotiterplatten aus Kunststoff beschrieben, die wahlweise mit Endothelzellen bewachsen werden können. (41, 104) Ein ähnliches Prinzip des Versuchsaufbaus ist in Form von sogenannten Biofilm-Reaktoren beschrieben. Sie bestehen aus kleinen Flusskammern, in denen die Probe einer konstanten Strömung ausgesetzt werden kann. (105, 106) Um eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation der IE zu gewährleisten, wurde ein Modell entwickelt, dass Schnitte von porcinen Herzklappen inkubiert. Die Inkubation findet jedoch wiederum nur statisch statt. (107, 108) Eine weitere

etablierte Modellart ist ein Modell mit simulierten endokardialen Vegetationen. Hierbei werden in vitro Vegetationen erzeugt, die in einem Ein-Kammer-Modell einem Medium mit enthaltenen Nährstoffen, Pathogenen und Pharmaka ausgesetzt werden können. Eine Strömung findet hier lediglich in Form eines am Gefäßboden befindlichen Magnetrührstabes statt, der jedoch primär die Aufgabe hat, das Medium zu mischen. (109-111) Auch aktuell wird dieses Modell für pharmakokinetische und pharmakodynamische Untersuchungen verwendet. (112, 113)

Keines der verfügbaren in vitro – Modelle simuliert eine IE an einer Herzklappe in toto und keines gewährleistet ein Biofilmwachstum unter einer physiologischen, pulsatilen Strömung.

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Die IE ist trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie weiterhin mit einer nahezu unverändert hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. (s. Kap. 1.1) Für viele Patienten ist die chirurgische Entfernung des infizierten Gewebes und im Falle einer Aortenklappen-IE die Implantation einer Herzklappenprothese die wichtige, die Prognose entscheidend verbessernde Therapieoption. (s. Kap. 1.5.2) Aktuelle Studiendaten zeigen jedoch, dass trotz formal bestehender Operationsindikation rund ein Viertel der Patienten tatsächlich nicht chirurgisch therapiert werden kann. (114) Für diese Patientengruppe werden alternative Therapiekonzepte benötigt.

Die Forschungsmöglichkeiten hierzu sind jedoch aufgrund der begrenzten Auswahl an zur Verfügung stehender Modelle eingeschränkt. Es mangelt vor allem an geeigneten in vitro – Modellen. Bisher ist kein Modell beschrieben, bei dem eine IE unter physiologischen Kreislaufbedingungen in vitro simuliert wird. (s. Kap. 1.6)

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines neuen, pulsatilen in vitro – Modells der infektiösen Endokarditis, mit dem unter physiologischen humanen Kreislaufbedingungen bakterielle Biofilme von ausgewählten Mikroorganismen auf porcinen Aortenklappen in toto erzeugt werden können. Die im Modell erzeugte Besiedlung sollte der einer klinischen, humanen IE gleichen. Um dies zu bewerten, sollte das Besiedlungsmuster der Klappen mittels FISH direkt visualisiert werden. Durch die Untersuchung verschiedener Areale der Aortenklappe sollten orientierend Prädilektionsstellen der Biofilmbildung identifiziert werden. Die Ergebnisse sollten reproduzierbar sein.

Das Modell soll als Forschungsgrundlage für neue Therapiekonzepte wie der Evaluation von therapeutischen und präventiven Device Coatings dienen. Diese können z.B. Basis für die Entwicklung von antiinfektiv-beschichteten Transkatheterklappen sein.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Entwicklung des in vitro - Kreislaufmodells**

#### **2.1.1 Anforderungen an das Modell**

Für die Konstruktion des Kreislaufmodells mussten spezielle Umstände und Anforderungen an das Modell beachtet werden. Es musste ein kompaktes System sein, das von seinen Maßen zur Biofilmerzeugung in einen Brutschrank und zum Sterilisieren in einen Autoklaven (LABOKLAV, SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss / Satuelle, Deutschland) passte. Alle verwendeten Materialien mussten autoklavierbar sein, sodass eine sterile Wiederverwendung aller Komponenten nach jedem Versuch gewährleistet war. Auch brauchte das Modell einen Öffnungsmechanismus, um die porcine Aortenwurzel in das Modell einsetzen zu können. Dies sollte möglichst anwenderfreundlich gestaltet sein, um unnötige Handgriffe beim sterilen Arbeiten zu vermeiden und das Kontaminationsrisiko zu reduzieren. Die Strömung über der Klappe sollte annähernd physiologische Charakteristika aufweisen und das System gegenüber der Umwelt mikrobiell abgeschirmt sein, damit nur Biofilme von dem ausgewählten, zugesetzten Erreger entstehen konnten.

#### **2.1.2 Aufbau und Funktion**

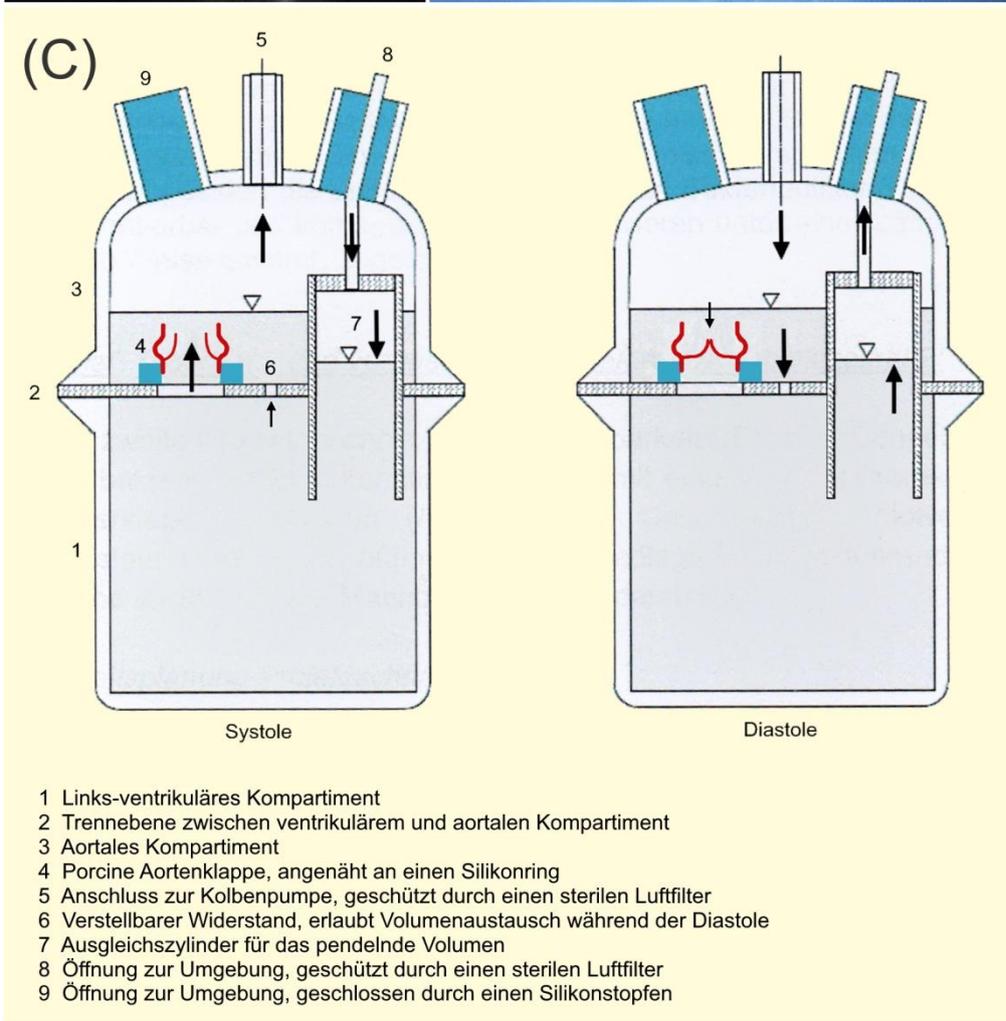
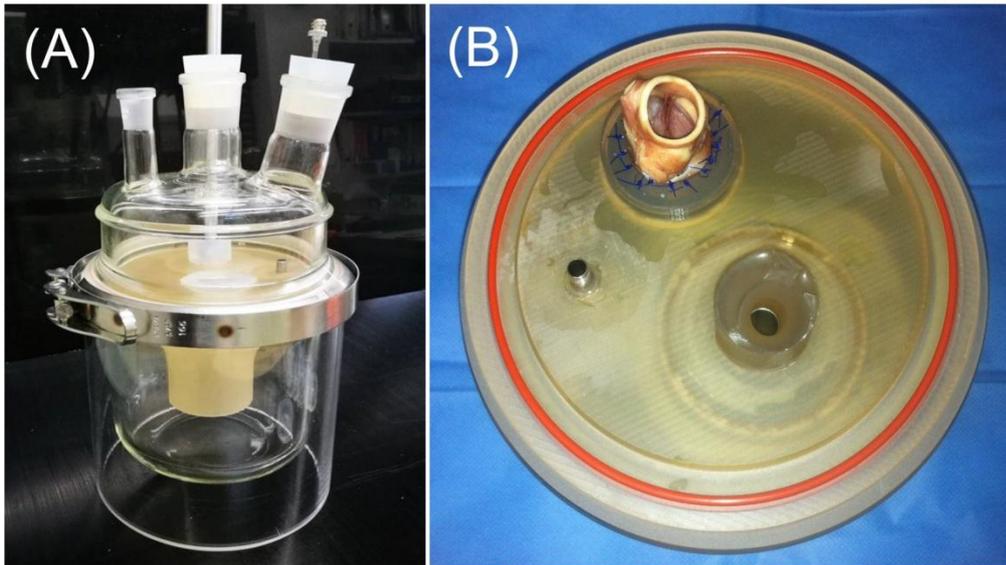
Das Konzept des Kreislaufmodells bestand aus einem gläsernen Durangefäß (DWK Life Science, Wertheim am Main, Deutschland) mit externer Kolbenpumpe (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Es wurde ein Gefäß mit zwei Kompartimenten erschaffen, wobei in einer Mittelebene die Aortenwurzel eingesetzt wurde. Angetrieben über die Kolbenpumpe sollte eine pulsatile, physiologische Strömung über der Aortenklappe entstehen und sich die Klappe dementsprechend in der Systole öffnen und in der Diastole schließen, um ihre physiologische Funktion in vitro zu simulieren. (Abb. 2)

Das Durangefäß bestand aus einer oberen und einer unteren Hälfte, welche durch eine speziell angefertigte Trennebene aus Polysulfon (PSU 1000, POLYTRON Kunststofftechnik, Bergisch Gladbach, Deutschland) voneinander baulich getrennt wurden, sodass ein oberes und ein unteres Kompartiment entstanden. Polysulfon wurde aufgrund seiner guten Verarbeitungsmöglichkeiten beim Fräsen und seiner Autoklavierfestigkeit ausgewählt. (115) Das obere Kompartiment entsprach der Aorta, das untere dem linken Ventrikel. Die bauliche Trennung wurde nur durch zwei Bohrungen in der Trennebene aufgehoben, eine größere (38 mm) für den Einsatz der Aortenwurzel und eine kleine (5 mm) zur Ermöglichung des

Volumenausgleichs während der Diastole und zur Widerstandsregulierung dabei. Um einen pulsatilen, kompartmentübergreifenden Volumenausgleich während der Pumpphasen generell möglich zu machen, enthielt die Trennebene auf der ventrikulären Seite (unten) außerdem einen ca. 250 ml fassenden Ausgleichszylinder, der über ein Steigrohr durch das aortale Kompartiment mit der Umwelt verbunden war. Dadurch konnte während der Pendelbewegung des Kolbens der Pegelstand im Modell entsprechend pulsatil mitwandern. Bewegte sich der Kolben von dem Modell weg entstand ein Unterdruck, sodass die Aortenklappe öffnete und Medium vom ventrikulären in das aortale Kompartiment strömte. Entsprechend sank der Pegelstand im Ausgleichszylinder. Bei der Umkehrung der Kolbenbewegung in Richtung des Modells wird das zuvor angesaugte Volumen wieder verdrängt, d.h. die Aortenklappe schließt und das Volumen strömt vom aortalen Kompartiment durch die kleine Ausgleichsbohrung der Trennebene wieder in das ventrikuläre Kompartiment. Folglich steigt der Pegelstand im Ausgleichszylinder wieder. (s. Abb. 2 (C))

Das Schlagvolumen (SV) und die Herzfrequenz (HF) der Kolbenpumpe waren frei einstellbar. So konnte das System einen physiologischen, pulsatilen Volumenstrom durch die Aortenklappe gewährleisten. Die Versuche liefen bei einem SV von 100 ml und einer HF von 50/min, was einem Herzminutenvolumen (HMV) von 5 l entsprach. Um eine physiologische Temperatur während der Versuche zu ermöglichen, wurde das Modell während der Versuchsdauer in einem Inkubatorschrank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37°C platziert.

Aus dem Aufbau des Modells wird ersichtlich, dass während des Pendelns des Kolbens mit folgendem Pendeln des Pegelstandes bei jeder Arbeitsphase des Kolbens über das Steigrohr des Ausgleichszylinders Luftvolumen aus der Umgebung in das Modell eingesaugt bzw. ausgestoßen wird. Um während der Versuche eine Kontamination mit luftgetragenen Erregern zu vermeiden, wurde jeweils zwischen Modell und Pumpe und zwischen Modell und Umgebung am Steigrohr ein steriler Atemluftfilter Pall Ultipor 100 (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) luftdicht befestigt. Außerdem musste das aus den zwei Kompartimenten und der Trennebene zusammengesetzte Modell, in das ca. 1500 ml Medium eingefüllt wurde, nach außen wasserdicht sein. Dies wurde erreicht, indem die beiden Kompartimente durch eine Klammer zusammengepresst wurden. Zwischen jedem Kompartiment und der Trennebene befand sich jeweils ein Dichtring aus Silikon (RCT Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, Deutschland). Weitere wiederverwendbare Teile waren Silikongummistopfen (Rotilabo, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für die Öffnungen des oberen Kompartiments und aus Silikongussmasse (Wacker Chemie, München, Deutschland) gegossene Ringe, an welche die Herzklappen angenäht wurden.



**Abbildung 2: In vitro - Kreislaufmodell**

(A): Frontalansicht des in vitro – Kreislaufmodells. In der Mitte ist die gelblich gefärbte Trennebene aus Polysulfon zu erkennen, in die die porcine Aortenwurzel eingesetzt wurde. Die Klammer in der Mitte verschloss die aortale (oben) und die ventrikuläre Kammer (unten) wasserdicht mit der Trennebene. Die oben an der aortalen Kammer befindlichen Öffnungen dienen zum Anschließen der Pumpe, Einfüllen des Mediums und Beimpfung mit Mikroorganismen (B): Draufsicht auf die Trennebene mit eingesetzter Aortenklappe. (C): Schematische Funktionskizze des Modells.

### **2.1.3 Weiterentwicklung des Modells**

Das Modell war eine komplette Neuentwicklung. Das im vorherigen Kapitel 2.1.2 gezeigte Modell war bereits eine weiterentwickelte Version des ersten Prototyps. Zur ersten Evaluation und Machbarkeit des Projektes wurden mit dem Prototyp Pilotversuche in Form von n=3 Sterilitätstests und insgesamt n=9 Versuchen zur Biofilmerzeugung durchgeführt. Die Ergebnisse der Pilotversuche werden in dieser Arbeit im Einzelnen nicht gezeigt.

Die Vermeidung von Kontaminationen durch externe Bakterien war die wesentliche Herausforderung der Etablierung und Weiterentwicklung des Modells. Die Weiterentwicklung umfasste sowohl konstruktive Änderungen als auch methodische Anpassungen. Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Protokolle beinhalten die methodischen Anpassungen, die durch Erkenntnisse aus den Pilotversuchen entstanden.

#### **2.1.3.1 Steriles Arbeiten**

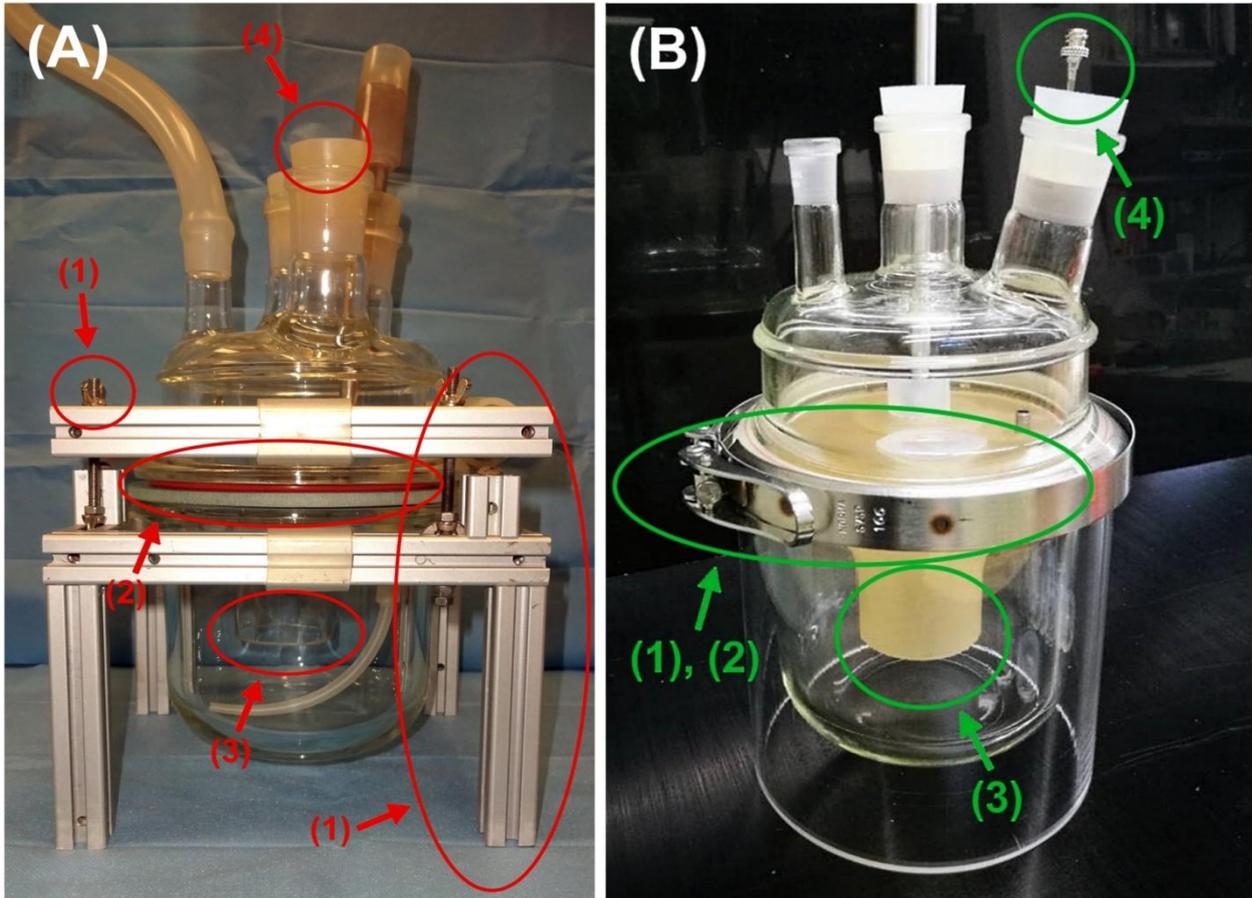
Um Kontaminationen in dem in vitro – Modell zu vermeiden, musste stets mit großer Sorgfalt möglichst steril gearbeitet werden. Alle Arbeitsschritte von der Präparation der Klappen bis zur Fixierung der fertigen Biofilmproben erfolgten grundsätzlich unter einer Laminarbank (Mars Safety Class 2, LaboGene ApS, Allerød, Dänemark). Vor Arbeitsbeginn wurde die Arbeitsfläche mit UV-Licht bestrahlt und mit mind. 70% Ethanol desinfiziert. Alle Arbeiten erfolgten stets auf einem sterilen OP-Tuch (BRAUN, Melsungen, Germany), mit autoklavierten Instrumenten und unter der Verwendung von sterilen Handschuhen (Gammex Latex, Ansell Healthcare, Melbourne, Australien). Bei den Versuchen zur Biofilmerzeugung wurden die sterilen Handschuhe nach jedem Arbeitsschritt, bei dem das Anfassen eines unsterilen bzw. nicht-autoklavierten Gegenstandes notwendig war, vor dem Berühren eines sterilen Gegenstandes – insbesondere des mit Kulturmedium befüllten, autoklavierten Modells – gegen neue ersetzt. Des Weiteren wurden während der Durchführung der Versuche ein Haarnetz (FarStar medical, Barsbüttel, Deutschland) und ein Mundschutz (DACH Schutzbekleidung, Bietigheim, Deutschland) getragen.

#### **2.1.3.2 Optimierung der Konstruktion**

Im Verlauf der Pilotversuche zeigten sich konstruktive Mängel am Prototyp des Modells, die in dem weiterentwickelten Modell behoben wurden. (Abb. 3) Der Prototyp hatte im Vergleich noch eine Trennscheibe aus Glas, in der keine Nut zur Zentrierung der Dichtringe eingearbeitet war,

sodass die Dichtringe beim Zusammenbauen des Modells manuell mittig zentriert werden mussten. Beim Einsetzen der Aortenklappe in das Modell erschwerte dies eine zügige und präzise Arbeitsweise enorm. Insbesondere in Kombination mit dem Aluminiumgerüst des Prototypen, das zur Dichtigkeit des Modells die Kompression der beiden Kompartimente durch das Anziehen von 4 Flügelmuttern erzeugte, war ein steriles Arbeiten unter der Laminarbank mit dem Prototypen aufgrund der komplexen und unhandlichen Handhabung stark erschwert. Beim neuen Modell kam daher eine deutlich anwenderfreundlichere Lösung mit einer speziellen Klammer (DWK Life Science, Wertheim am Main, Deutschland) und einem Standfuß aus Plexiglas zum Einsatz. Zur Selbstzentrierung der Dichtringe wurde jeweils eine passende Nut in die obere Fläche des ventrikulären Glaskompartiments und in die neue Trennebene aus Polysulfon gefräst, sodass die Dichtringe beim aufrecht stehenden Modell entsprechend der Schwerkraft in ihrer Zentrierungsnut blieben und somit nicht verschieblich waren.

Des Weiteren entstand beim Prototyp häufig das Problem, dass das Medium im Ausgleichszylinder bis in das Steigrohr aufschäumte und der dort befestigte Luftfilter nass wurde. Dies stellte ein weiteres Kontaminationsrisiko dar, da die Integrität des Filters so nicht mehr gewährleistet war. Um dies zu vermeiden, wurde das Volumen des Ausgleichszylinders von ca. 150 ml auf ca. 250 ml vergrößert und die in Kapitel 2.6 beschriebene Vorrichtung zum Adjustieren des Pegelstandes im Ausgleichszylinder an einem der oberen Stopfen montiert. Weiterhin kam es beim Prototyp zu einem steigenden Pegelstand im Ausgleichszylinder, was das Problem des Nasswerdens des Filters am Steigrohr verschärfte. Die Ursache bestand in Luftbläschen, die bei erhöhtem Pegelstand im Ausgleichszylinder beim Pendeln und folgendem Ein- und Austreten des Pegelstandes in das Steigrohr während des Austretens (Systole) aus dem Steigrohr in das Medium strömten und nicht vom Ausgleichszylinder aufgefangen wurden. So sammelte sich ein Luftvolumen unter der Trennebene und verschob den Pegelstand im Ausgleichszylinder weiter nach oben. Im verbesserten Modell wurde daher der Durchmesser des Steigrohres vergrößert, was zu einer verminderten Strömungsgeschwindigkeit führte, und das Eintrittsprofil des Steigrohres in den Ausgleichszylinder angepasst, indem das Ende des Rohres verblommt wurde und dafür zwei seitliche Öffnungen eingefügt wurden.



### Abbildung 3: Konstruktive Weiterentwicklung des Modells

(A): Prototyp. Das Aluminiumgerüst (1) des Prototyps erzeugte durch Anziehen von 4 Flügelmutter (1) Kompression auf die an der Trennebene manuell zentrierten Dichtringe (2). Das sterile Einsetzen der Aortenklappe war aufgrund dieser Konstruktion sehr unhandlich und stellte ein Kontaminationsrisiko dar. Der Ausgleichszylinder (3) war zu klein dimensioniert und es fehlte die Möglichkeit den Pegelstand zu adjustieren (4), sodass der Filter nass wurde. Durch den zu kleinen Ausgleichszylinder in Kombination mit dem offen hineinragenden Steigrohr wurden hinausströmende Luftbläschen nicht suffizient vom Ausgleichszylinder aufgefangen, sodass sich die Luft unterhalb der Trennebene sammelte.

(B): Weiterentwickeltes Modell. Das Aluminiumgerüst des Prototyps wurde durch eine speziell angepasste Klammer mit einem Standfuß aus Plexiglas ersetzt (1), sodass die Handhabung des Modells deutlich besser mit den Anforderungen des Arbeitens unter der Laminarbank vereinbar war. In einer neuen Trennebene aus Polysulfon und in das untere Glaskompartiment war zur einfacheren Zentrierung der Dichtringe jeweils eine Nut eingefräst, was die Handhabung des Modells weiter verbesserte (2). Durch einen um über 100% vergrößerten Ausgleichszylinder (3) und die Möglichkeit, durch eine Kanüle (4) den Pegelstand zu adjustieren (s. Kap 2.6), wurde ein Nasswerden des Filters am Steigrohr verhindert. Durch einen größeren Durchmesser und ein seitliches Eintrittsprofil des Steigrohres in den Ausgleichszylinder wurde im weiterentwickelten Modell außerdem das Phänomen verhindert, dass Luftbläschen aus dem Ausgleichszylinder austraten und sich unterhalb der Trennebene sammelten.

#### **2.1.4 Druckmessung**

Es wurde eine Druckmessung im aortalen Kompartiment des Modells durchgeführt. Hierfür wurde eine wie in Kapitel 2.2 und 2.3 beschrieben behandelte porcine Aortenklappe in das Modell eingesetzt und ca. 1500 ml Wasser eingefüllt. Des Weiteren wurde vor dem Starten der Pumpe wie in 2.6 beschrieben der Pegelstand im Ausgleichszylinder adjustiert. Über einen am selben Dreiwegehahn (s. Kap. 2.6) angeschlossenen Drucktransmitter (CTE / CTU8000, First Sensor AG, Berlin, Deutschland) wurde der im aortalen Kompartiment anliegende Druck über eine Versuchsdauer von ca. 1-2 Minuten über die Software LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, USA) gemessen.

#### **2.1.5 Sterilitätstests**

Weiterhin wurden n=3 Sterilitätstests durchgeführt. Hierfür wurde das Modell autoklaviert und mit 1500 ml autoklaviertem Tryptone Soy Broth without Dextrose – Kulturmedium (TSB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) befüllt. Eine porcine Aortenklappe wurde nicht eingesetzt. Das Modell wurde so bei 37°C für 24 h mit einem HMV von 5 l betrieben. Anschließend wurde das Medium visuell auf Hinweise eines mikrobiellen Wachstums untersucht und es wurde unter der Laminarbank eine Probe des Mediums auf einer Agarplatte (Columbia Agar Sheep Blood Plus, OXOID, Basingstoke, UK) ausgestrichen. Die Agarplatte wurde danach für mindestens 24 h bei 37°C gelagert.

Zusätzlich wurde die Sterilität der porcinen Aortenklappen nach deren Fixation überprüft. Hierfür wurden n=2 Klappen mit FISH und n=3 Klappen durch Inkubation in TSB für 48 h bei 37°C untersucht. Von dem TSB wurde nach der Inkubation jeweils eine Probe auf Agar ausgestrichen.

### **2.2 Präparation und Fixation porciner Aortenklappen**

Die porcinen Herzen wurden von einem örtlichen Schlachtbetrieb käuflich erworben. Die Präparation der Aortenwurzeln erfolgte ca. 24 h nach der Schlachtung, bis dahin wurden sie bei 4°C gelagert. (116, 117) Die freipräparierten Aortenwurzeln wurden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (pH 7,4) (ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) von anhaftendem Blut und anderen Verschmutzungen gereinigt. Es erfolgte eine Fixierung in 0,6% Glutaraldehyd-PBS-Lösung (GA) (Glutaraldehyd, 25% in H<sub>2</sub>O, Reinheit für Elektronenmikroskopie, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 24 h bei Raumtemperatur, anschließend wurde die Lösung

verworfen. Eine weitere Fixierung erfolgte ebenfalls in 0,6% GA für mindestens 6 Tage bei 4°C. (118, 119) Zum Formerhalt der Taschen der Herzklappen wurden sie mit sterilen Kompressen (BRAUN, Melsungen, Germany) ausgepolstert. (120) Nach der Fixierung wurden die Aortenwurzeln feinpräpariert und bis zu ihrer Verwendung in 0,6% GA bei 4°C gelagert. Die Fixation und Lagerung erfolgte stets in sterilen Bechern (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland).

### **2.3 Annähen der Aortenwurzel an einen passenden Silikonring**

Um die Aortenklappen in das in vitro – Modell einsetzen zu können, mussten sie an einen Silikonring angenäht werden. Es standen dafür Silikonringe mit den Durchmessern 24, 26 und 28 mm zur Verfügung. Die Laminarbank wurde zum keimarmen Arbeiten wie in 2.1.3.1 beschrieben vorbereitet. Entsprechend der Größe der Aortenwurzel wurde ein passender, autoklavierter Silikonring ausgesucht, an den die Aortenwurzel an ihrem ventrikulären Rand mit einer Einzelknopfnäht angenäht wurde. Der Abstand zwischen zwei Einzelknopfstichen betrug maximal 3 mm, um die Aortenwurzel möglichst dicht an den Silikonring anzunähen und so Leckströme zu vermeiden. Als Nahtmaterial diente ein nicht resorbierbarer, monofiler Faden (PROLENE, Ethicon, Cincinnati, OH, USA).

Die Aortenwurzel samt Silikonring wurde mindestens über Nacht in frischem 0,6% GA in einem neuen sterilen Becher bei 4°C gelagert. Je nach Bedarf wurden die angenähten Klappen so bis zu ihrer Verwendung gelagert.

### **2.4 Waschen porciner Aortenklappen**

Bevor die an einen Silikonring angenähten Herzklappen im in vitro – Modell eingesetzt wurden, wurden sie in PBS gewaschen, um freies Glutaraldehyd zu entfernen, das aufgrund seiner Toxizität möglicherweise hinderlich für das Wachstum der Biofilme gewesen wäre. Dazu wurden die Herzklappen zunächst zur ersten Verdünnung für 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS inkubiert. Danach erfolgte ein 3-maliger Wechsel des PBS und Inkubation für jeweils 15 Minuten. Die so gewaschene Herzklappe wurde für 24 Stunden bei 4°C in PBS gelagert und am folgenden Tag zur Biofilmerzeugung im Kreislaufmodell genutzt. (119)

## 2.5 Kultur von *Staphylococcus epidermidis* PIA 8400

Als IE-erzeugendes Pathogen wurde in dem Modell die als Biofilm-bildend bekannte Spezies *Staphylococcus epidermidis* PIA 8400 (H. Rohde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) genutzt. (121) Die Kultivierung fand stets auf Agarplatten aus bovinem Blut bei 37°C statt. Der CO<sub>2</sub>-Anteil entsprach dem der Raumluft. Eine mit dem MicroBank™ – System (Pro-Lab Diagnostic, Richmond Hill, Canada) bei -80°C gelagerte Probe der Spezies wurde zu Beginn des Projektes einmalig ausgestrichen und kultiviert. Die so erhaltene, bewachsene Platte wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert. Zwei Tage vor einem Versuch wurde ausgehend von dieser Platte eine frische, neue Kultur des *S. epidermidis* auf Agar kultiviert. Aus dieser Kultur wurde dann am Tag vor Versuchsstart eine Vorkultur hergestellt. Hierzu wurden 30 ml TSB in ein steriles Zentrifugenröhrchen (50 ml, BIOLOGIX, Jinan, China) gefüllt und drei CFU des *S. epidermidis* hinzugegeben. Das Zentrifugenröhrchen mit der Vorkultur lagerte für ca. 24 h auf einem Plattformschüttler (Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) bei ebenfalls 37°C. Die ältere, bei 4°C lagernde Agarplatte mit *S. epidermidis* PIA 8400 wurde stets durch die jeweils neuere Platte als Ausgangsbasis für den nächsten Versuch ersetzt.

## 2.6 Biofilmerzeugung

Zuerst wurden 1500 ml TSB entsprechend der Herstellerangaben hergestellt. Das Modell wurde zusammgebaut, mit 1000 ml des Mediums befüllt und dann autoklaviert. Die weiteren 500 ml des TSB wurden ebenfalls autoklaviert. Nachdem das autoklavierte Modell auf ca. 37°C abgekühlt war, wurde es unter der Laminarbank platziert und eine entsprechend den Kapiteln 2.2 bis 2.4 vorbereitete porcine Aortenwurzel eingesetzt. Das Modell wurde geschlossen und die restlichen 500 ml des TSB eingefüllt. Anschließend erfolgte die Beimpfung mit dem Erreger *Staphylococcus epidermidis* PIA 8400 aus einer TSB-Vorkultur. (s. Kap. 2.5) Die Beimpfung erfolgte stets geeicht über die optische Dichte (OD) der Vorkultur, die in einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) ermittelt wurde. Es wurden hierbei je nach Versuch zwei verschiedene Titrierungen verwendet. Das geringere Inokulum betrug 1 ml der Vorkultur mit einer OD von 0,1, das höhere Inokulum 10 ml der Vorkultur mit einer OD von 0,1. Eine einmalige Auszählung der Koloniebildenden Einheiten („Colony Forming Units“, CFU) und Hochrechnung auf das Gesamtvolumen des Modells ergab für das geringere Inokulum eine Titrierung von  $1,5 \times 10^4$  CFU/ml und für das höhere Inokulum  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml. Anschließend wurden unter der Laminarbank die sterilen Luftfilter und eine Vorrichtung zum Adjustieren des Pegelstandes im Ausgleichszylinder angebracht. Letztere bestand aus einer Kanüle mit einem

Gewinde, die durch einen der oberen Silikonstopfen im aortalen Kompartiment gestochen wurde. An dem Gewinde wurden ein steriler Dreiwegehahn (BRAUN, Melsungen, Germany) und eine 50 ml Spritze (BRAUN, Melsungen, Germany) angeschlossen. Nachdem das so vorbereitete Modell an der Kolbenpumpe im Inkubatorschrank angeschlossen worden war, wurde über den Dreiwegehahn und die Spritze ein Luftvolumen von 150 ml aus dem aortalen Kompartiment abgesaugt, sodass der Pegelstand im Ausgleichszylinder um das entsprechende Volumen sank. So konnte das in Kapitel 2.1.3.2 beschriebene Problem eines zu hohen Pegelstandes im Ausgleichszylinder und damit ein konsekutives Nasswerden des Luftfilters verhindert werden. Zum Schluss wurde die Einstellung der Pumpparameter überprüft und die Kolbenpumpe wurde eingeschaltet. Ferner musste strikt darauf geachtet werden, dass der Kolben vor dem Anschließen des Modells und Absaugen des Luftvolumens im vorderen, d.h. dem Modell zugewandten Totpunkt stand. Dadurch wurde sichergestellt, dass der erste Arbeitstakt der Pumpe der Systole entsprach, was für die Volumenverhältnisse im Modell und folglich der ordnungsgemäßen Funktion desselben von wichtiger Bedeutung war. Alle Versuche wurden standardmäßig mit einer Kultur des Mediums und FISH aller Proben analysiert. Stichprobenartig erfolgte zusätzlich eine spezifische FISH und eine real-time PCR.

### **2.6.1 Etablierungsversuche**

Zur Evaluation der optimalen Titrierung des Modells und der Versuchsdauer wurden n=4 Etablierungsversuche zur Biofilmerzeugung durchgeführt. Hierfür wurde das Modell wie beschrieben vorbereitet. (s. Kap. 2.6) Die Etablierungsversuche wurden mit verschiedenen Inokula über eine unterschiedliche Zeit durchgeführt. Die ersten zwei Etablierungsversuche liefen mit einem Inokulum von  $1,5 \times 10^4$  CFU/ml für jeweils 24 h bzw. 40 h, die zwei folgenden mit  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml für ebenfalls 24 h bzw. 40 h. (Tab. 3)

### **2.6.2 Reproduktionsversuche**

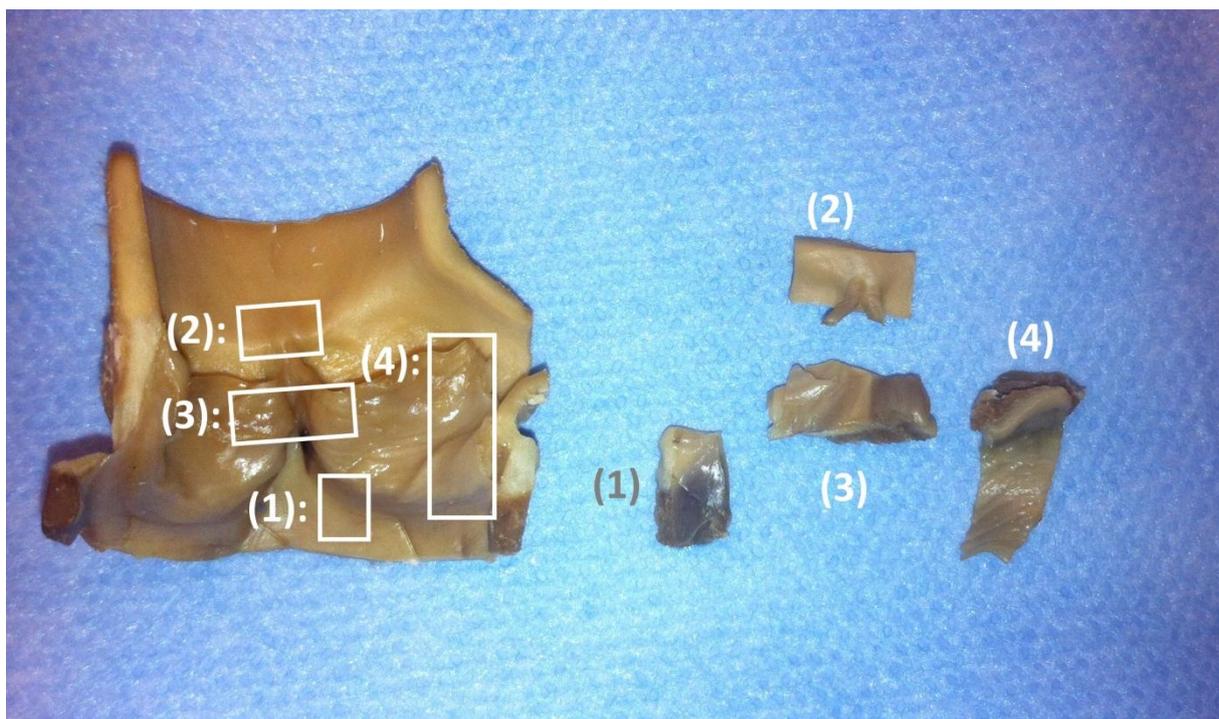
Um die Reproduzierbarkeit der in den Etablierungsversuchen erzeugten Biofilme zu untersuchen, wurden n=3 Versuche unter identischen Bedingungen durchgeführt. Das Inokulum betrug  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml und die Versuchsdauer 24 h. (Tab. 3)

	Inokulum	Versuchsdauer
Etablierungsversuch 1	$1,5 \times 10^4$ CFU/ml	24 h
Etablierungsversuch 2	$1,5 \times 10^4$ CFU/ml	40 h
Etablierungsversuch 3	$1,5 \times 10^5$ CFU/ml	24 h
Etablierungsversuch 4	$1,5 \times 10^5$ CFU/ml	40 h
Reproduktionsversuche (n=3)	$1,5 \times 10^5$ CFU/ml	24 h

Tabelle 3: Übersicht der Versuche zur Biofilmerzeugung

## 2.7 Probenentnahme

Nach dem Ende eines Versuchs wurden Proben aus der im Modell inkubierten Aortenwurzel entnommen. Um in der späteren Analyse auch Hinweise auf mögliche Unterschiede in der bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung bzw. möglicher Prädilektionsstellen hierfür gewinnen zu können, wurde pro Versuch an vier verschiedenen Lokalisationen jeweils eine Probe entnommen. (Abb. 4) (122) Die Probenentnahme erfolgte ebenfalls mit autoklavierten Instrumenten unter der Laminarbank. Die Proben wurden einzeln jeweils in einem Fish-Fix-Röhrchen (MOKI Analytics, Berlin, Deutschland) bei 4°C fixiert und bis zu ihrer Weiterverarbeitung so gelagert.



**Abbildung 4: Lokalisationen der Probenentnahme**

(1): inter leaflet triangle, (2): Kommissur, (3): lateraler Taschenquerschnitt, (4): mittlerer Taschenquerschnitt

## 2.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung war die Methode zur Untersuchung der Proben auf bakterielle Adhäsion und die Bildung von Biofilmen. Wie bereits in Kapitel 1.4.4.3 beschrieben ist die FISH ein Mikroskopieverfahren, bei dem Fluoreszenz-markierte Sonden an eine Zielstruktur der Erreger binden und diese so in ihrer natürlichen Umgebung direkt visualisiert werden können. Die FISH eignet sich somit hervorragend für die Diagnose und Erforschung von Biofilmen. Bei jedem Versuch wurde von jeder der vier entnommenen Lokalisationen bzw. Proben jeweils ein Schnitt mittels FISH untersucht.

### 2.8.1 Prozessierung der Proben

Nach ca. 24 h Inkubation in FishFix wurden die Proben entsprechend der Herstellerangaben mit dem Kunststoffeinfettssystem Technovit 8100 (Kulzer, Hanau, Deutschland) in einer Histoform S (Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet. Alle folgenden Schritte zur Einbettung der Proben fanden bei 4°C statt. Die in FishFix fixierten Proben wurden über Nacht in PBS mit einem Anteil von 6,8% (w/v) Saccharose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Anschließend fand für mindestens 1 h zur Dehydratation des Gewebes eine Inkubation in 100% Aceton (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) statt. Danach wurde die Probe mit dem Kunststoffeinfettssystem infiltriert. Dazu wurde die Probe für mindestens 6 h, meistens über Nacht, mit der Infiltrationslösung bestehend aus 100 ml Technovit 8100 Basislösung und 0,6 g Technovit 8100 Härter 1 inkubiert. Die so behandelten Proben wurden dann in der Histoform S eingebettet. Hierbei wurde darauf geachtet die gewonnenen Proben in den Einbettmulden der Histoform S so aufzustellen, dass sie auf der Schnittfläche standen, damit beim Schneiden der Proben in die auswertbaren Schnitte ein Querschnitt durch die luminale Seite der Probe entstand. Für die spätere Auswertung wurde protokolliert, welche Seite der Probe die luminale Seite war, da nur diese für die Auswertung von Relevanz war. Die Einbettmulden wurden dann mit der Polymerisationslösung (15 ml Infiltrationslösung + 0,5 ml Technovit 8100 Härter 2) gefüllt und mit einer Polyethylen-Folie (Kulzer, Hanau, Deutschland) luftdicht abgedeckt. Für die Polymerisation des Kunststoffes wurde die Form für mindestens 3 h bei 4°C gelagert. Zum Entnehmen der Proben aus der Form wurden die eingebetteten Proben mit Histobloc (Kulzer, Hanau, Deutschland) und Technovit 3040 (Kulzer, Hanau, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben aufgedeckt. (123)

Die erhaltenen Blöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom (Rotary Medim DDM 0036, Leica, Wetzlar, Deutschland) unter der Verwendung eines Hartmetallmessers in 2 µm dicke Schnitte geschnitten. Jeder Schnitt wurde in einem Bad aus destilliertem Wasser geglättet und auf einen

Polysine®-Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mittig aufgebracht. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte für mindestens 2 h bei 37°C getrocknet.

## 2.8.2 Oligonukleotid-Sonden

Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte an der ribosomalen 16S rRNA mit Oligonukleotid-Sonden. Je nach Design der zur Zielsequenz komplementären Sequenz der Sonde ist eine Bindung auf jeder taxonomischen Stufe möglich. (92) Standardmäßig wurden bei allen Versuchen die Domänen-spezifische, panbakterielle Sonde EUB338 (biomers.net, Ulm, Deutschland), für den Ausschluss von unspezifischen, sozusagen falsch-positiven Bindungen die Sonde non-EUB338 (biomers.net, Ulm, Deutschland) und für eine generelle Zell- bzw. Zellkernvisualisierung der Nukleinsäure-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. (92, 123-125) Stichprobenartig wurde zusätzlich in einer weiteren FISH die für *Staphylococcus* spp. Gattung-spezifische Sonde STAPH und die für *Staphylococcus aureus* Spezies-spezifische Sonde SAU zur Analyse der Biofilme genutzt. (Tab. 4) (126, 127) Um eine gleichzeitige, jedoch unterscheidbare Visualisierung der verwendeten Sonden zu ermöglichen, waren die Sonden vom Hersteller jeweils mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Emissionsmaxima markiert worden. EUB338 war mit dem Cyanin Cy3 und non-EUB338 mit Cy5 markiert, STAPH mit dem Fluorescein Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und SAU ebenfalls mit Cy3. (Tab. 5) (92, 123)

Sonde	Sequenz (5'→3')	
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann et al. (124)
non-EUB338	CGACGGAGGGCATCCTCA	Wallner et al. (125)
STAPH	TCCTCCATATCTCTGCGC	Trebesius et al. (126)
SAU	GAAGCAAGCTTCTCGTCCG	Kempf et al. (127)

**Tabelle 4: Übersicht der Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Sonden**

Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe
Cy3	550 nm	570 nm	Orange
Cy5	650 nm	670 nm	Infrarot
FITC	494 nm	520 nm	Grün
DAPI	360 nm	490 nm	Blau

**Tabelle 5: Übersicht der Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff**

### 2.8.3 Durchführung der FISH

Die wie in Kapitel 2.8.1 beschriebenen vorbereiteten Schnitte wurden zunächst zwecks Aufschließung der Zellwand der grampositiven Kokken mit den Enzymen Lysozym (1 mg/ml in bidest. H<sub>2</sub>O, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Lysostaphin (1 mg/ml in 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0, Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Bei diesem und den folgenden Schritten war das Einhalten der angegebenen Temperaturen sehr wichtig. Die genannten Enzyme wurden zuvor auf 30°C vorgewärmt und die Inkubation des Schnittes fand ebenfalls bei 30°C auf einem Heizblock (HybaidOmniGene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) statt. Pro Schnitt wurden zuerst 30 µl Lysozym aufgebracht. Nach 10 min wurden 10 µl Lysostaphin hinzugegeben. Nach 5 min wurde dann der Objektträger mit Aqua bidest. abgespült und bei 50°C getrocknet. Anschließend wurde der Schnitt mit 20 µl des jeweiligen Sondenmix inkubiert, welcher zuvor auf 50°C vorgewärmt wurde. Der standardmäßige Sondenmix bestand aus 17 µl Hybridisierungspuffer (40% Formamid (v/v), Merck, Darmstadt, Deutschland) und jeweils 1 µl der Sonden EUB338, non-EUB338 und 1 µl DAPI. Der spezifische Sondenmix beinhaltete 16 µl Hybridisierungspuffer, 1 µl STAPH, 1 µl SAU und 1 µl DAPI. Die Inkubation der Objektträger erfolgte für mind. 2 h in ebenfalls vorgewärmten, lichtgeschützten Inkubationskammern mit Feuchtigkeitsreservoir bei 50°C. Um ungebundene Sonden zu entfernen, wurde der Objektträger nochmals mit Aqua bidest. abgespült und erneut bei 50°C getrocknet. Zum Schluss wurden 2 Tropfen von dem Eindeckmedium VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mittig auf den Schnitt aufgetragen und darauf ein Deckglas (Menzel, Braunschweig, Deutschland) gelegt. Diese Schritte, der Transport und die Analyse der Objektträger erfolgten unter lichtarmen Verhältnissen. Bei Bedarf wurden die so behandelten Objektträger lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Um die Sensitivität und Spezifität der FISH zu kontrollieren, wurde bei jeder FISH entsprechend des verwendeten Sondenmix eine Positiv- und/oder Negativkontrolle durchgeführt. Hierfür dienten beim standardmäßigen Sondenmix *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia Coli* ATCC 25922 als Positivkontrolle, beim spezifischen Sondenmix *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Staphylococcus epidermidis* PIA 8400 als Positiv- und *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 und *Escherichia Coli* ATCC 25922 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland) als Negativkontrolle. Die Hybridisierung der Kontrollen erfolgte wie zuvor beschrieben auf einem Polysine®-Objektträger, jedoch wurden geringere Mengen der Reagenzien verwendet (Lysozym 15 µl, Lysostaphin 5 µl, Sondenmix 10 µl).

## **2.8.4 Mikroskopische Auswertung**

Die mikroskopische Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiolmager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) unter der Verwendung von Schmalbandfiltern (F36-503 (Cy3), F41-008 (Cy5), F46-002 (FITC), F36-513 (DAPI), AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) und verschiedenen Objektiven (10x, 40x, 100x Ölimmersion, Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Axiocam 506 Mono (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und der ZEN Blue Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) digital. Vor der Analyse der Proben wurden die Kontrollen untersucht.

Die mikroskopische Auswertung der n=4 Etablierungsversuche erfolgte qualitativ. Die gesamte luminale Oberfläche des Schnittes und das hiervon basal liegende Gewebe wurde auf das Vorhandensein von detektierten Mikroorganismen untersucht und es wurde hierbei zwischen den Kategorien bakterielle Adhäsion, Mono- bis Mehrfach-Layer, Mikrokolonie und Biofilm unterschieden. Bei den n=3 Reproduktionsversuchen wurde zusätzlich mit Hilfe der Software die Besiedlung in Bezug auf Dicke und Invasivität manuell vermessen.

## **2.9 Real-time PCR**

Als weitere Methode für den direkten, molekularbiologischen Erregernachweis wurde stichprobenartig eine real-time PCR durchgeführt.

### **2.9.1 Isolierung der RNA**

Zuerst erfolgte die Isolierung und Aufreinigung der RNA der Proben. Sie erfolgte aus 15 Schnitten der eingebetteten Probe mit Hilfe des Rneasy Mini Kits (Qiagen, Venlo, Niederlande) entsprechend der Herstellerangaben.

### **2.9.2 Reverse Transkription**

Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurde hierfür das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) entsprechend der Herstellerangaben. Die folgenden Reagenzien stammen aus dem Kit. 12 µl der isolierten RNA wurden mit 2 µl gDNA Wipeout Puffer bei 42°C inkubiert (Thermocycler UNO II, Biometra, Göttingen, Deutschland) und die Reaktion durch sofortiges Stellen der Probe auf Eis nach 2 min

gestoppt. Der Mix zur Umschreibung der RNA bestand aus 4 µl Reverser Transkriptase, 1 µl 5-fach RT Puffer und 1 µl RT Primer Mix. Dieser Mix wurde zu dem RNA-Ansatz hinzugefügt und 15 min bei 42°C im Thermocycler inkubiert, danach nochmals für 3 min bei 98°C, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

### **2.9.3 Durchführung der PCR**

Mit der so erzeugten cDNA wurde nun eine PCR mit Hilfe des HotStar DNA Polymerase Kits (Qiagen, Venlo, Niederlande) und des dNTP-Sets PCR Grade 100 mM (Qiagen, Venlo, Niederlande) durchgeführt. Die PCR erfolgte aus 5 µl der cDNA und 45 µl eines PCR-Mix bestehend aus 0,2 µl HotStar Taq Polymerase, 0,5 µl TPU1 Primer (biomers.net, Ulm, Deutschland), 0,5 µl RTU3 Primer (biomers.net, Ulm, Deutschland), 1 µl dNTP's (10 mM), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µl 10-fach PCR Puffer und 35,8 µl H<sub>2</sub>O. Zur Amplifikation wurde dieser Ansatz im Thermocycler entsprechend den Herstellerangaben mehreren Zyklen erhöhter Temperatur ausgesetzt.

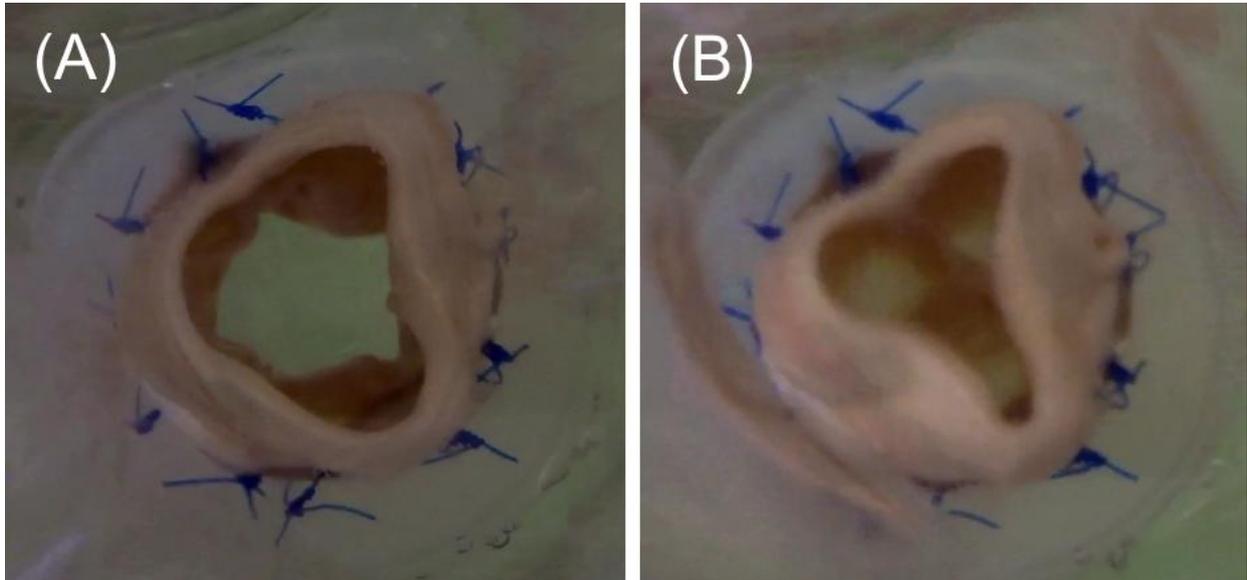
### **2.9.4 Geldokumentation**

Für den Nachweis des PCR Amplifikats wurde ein 2% Agarose Gel hergestellt, das vor dessen Festwerden mit 2,5 µl Midori Green (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) versetzt wurde. In eine Geltasche wurden 10 µl bestehend aus 5 µl PCR Amplifikat und 5 µl Orange G Beladungspuffer (30 mg Bromphenolblau (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 15 ml Glycerin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 6 ml EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,3 ml Tris-HCl, 30 ml Aqua dest.) pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurde der Marker ΦX174 RF DNA/Hae III Fragments (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dem Gel hinzugefügt. Nach 90 min bei 100 mV wurde das Gel aus der Kammer genommen. Mit Hilfe der G Box (Syngene, Bangalore, Indien) wurden die Banden bei 530 nm (Emissionsmaximum von Midori Green) sichtbar gemacht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klappenfunktion im in vitro – Modell

In einem Testlauf des Modells mit Wasser wurde eine regelrechte Klappenfunktion im Sinne eines pulsatilen Öffnens und Schließens aller drei Taschen der Klappe beobachtet. (Abb. 5)

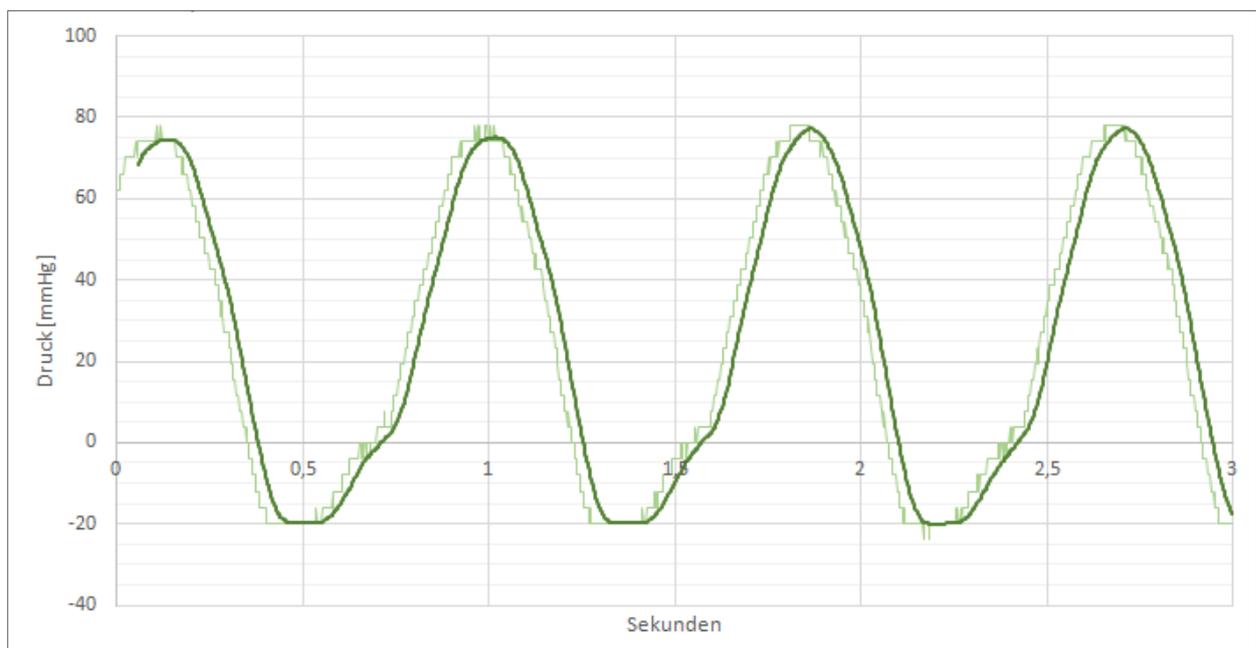


#### **Abbildung 5: Trikuspidale Klappenfunktion**

Während eines Versuchs des Modells mit eingesetzter Aortenklappe und mit Wasser als Medium wurde makroskopisch die Klappenfunktion beobachtet. (A): Während der Saugphase der Kolbenpumpe öffnen alle drei Taschen der Aortenklappe. (B): Drückt der Kolben das zuvor angesaugte Volumen wieder zurück in das Modell schließen alle drei Taschen vollständig, sodass die freien Ränder der Taschen aneinander liegen.

## 3.2 Druckmessung

In einer Druckmessung zeigte sich, dass im aortalen Kompartiment des Modells bei einer HF von 70/min und einem SV von 100 ml ein Druck von ca. 75-78 mmHg gegen die geschlossene Aortenklappe erzeugt wurde, was einem physiologischen diastolischen Blutdruck entspricht. Bauartbedingt wurde die Klappenöffnung durch einen Unterdruck erzeugt, da die treibende Kraft für die Klappenöffnung das Ansaugen des Kolbens war. Dieser Umstand zeigte sich während der Druckmessung mit einem negativen Druck von ca. -20 mmHg im aortalen Kompartiment während dem Öffnen der Aortenklappe bzw. der Systole des Modells. (Abb. 6)



**Abbildung 6: Druckmessung im aortalen Kompartiment**

Es wurde der Druck im aortalen Kompartiment mit eingesetzter Aortenklappe bei einer HF von 70/min und einem SV von 100 ml gemessen. Während der Diastole zeigt sich ein physiologischer Druck von bis zu 78 mmHg gegen die geschlossene Aortenklappe, während der Systole ist der Druck bauartbedingt negativ und erreicht einen Wert von -20 mmHg.

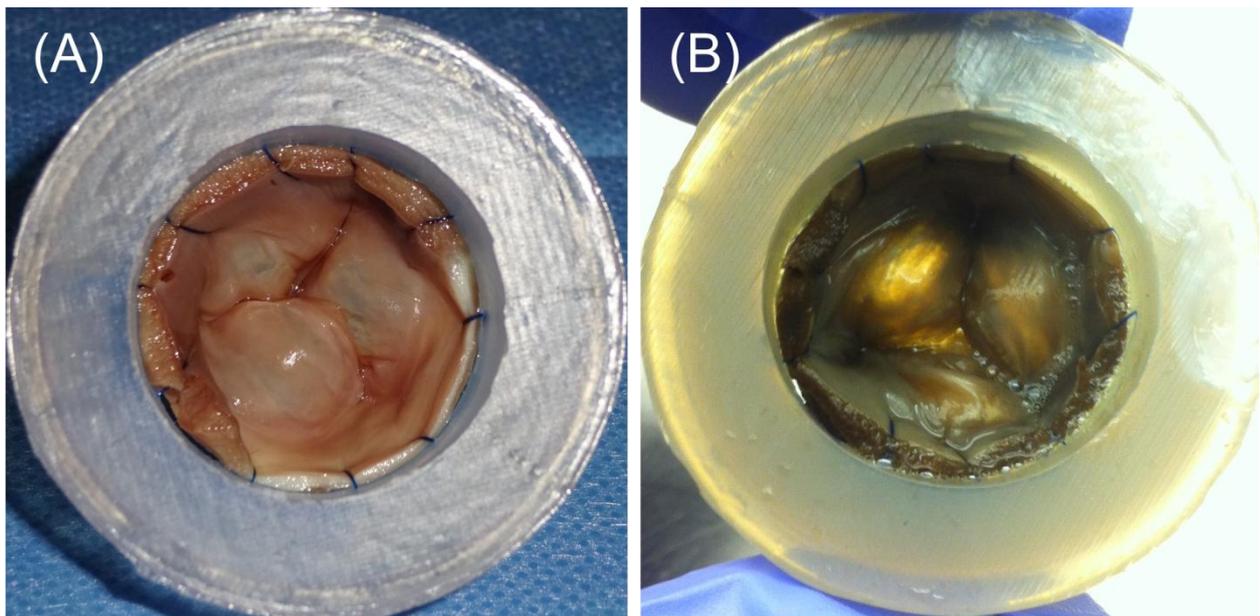
### 3.3 Sterilitätstests

Während der n=3 Sterilitätstests wurde über den gesamten Zeitraum von 24 h makroskopisch im Kulturmedium kein mikrobielles Wachstum festgestellt. In der Kultur auf Agar zeigte sich ebenfalls in keinem der Versuche ein Wachstum von Mikroorganismen.

In der Analyse mittels FISH von n=2 Aortenklappen nach 7 d Fixation in 0,6% GA konnten keine aktiven Mikroorganismen beobachtet werden. Die n=3 Aortenklappen, die für 48 h in TSB inkubiert wurden, erzeugten kein makroskopisch sichtbares mikrobielles Wachstum. In der Kultur des TSB auf Agar zeigte sich ebenfalls kein mikrobielles Wachstum.

### 3.4 Biofilmerzeugung

In allen insgesamt 7 Versuchen zur Biofilmerzeugung auf porcinen Aortenwurzeln zeigte die makroskopische Untersuchung der Aortenklappe eine intakte Klappenanatomie und regelrechte Funktion sowohl bei den Versuchen nach 24 h als auch nach 40 h. Die Klappen wurden durch die Versuche livide und dunkel verfärbt und teilweise war ein transparenter Schleim anhaftend. (Abb. 7) Bakterielle Vegetationen wurden makroskopisch nicht beobachtet.



**Abbildung 7: Makroskopischer Vergleich einer porcinen Aortenklappe vor und nach dem Betrieb im in vitro – Modell**

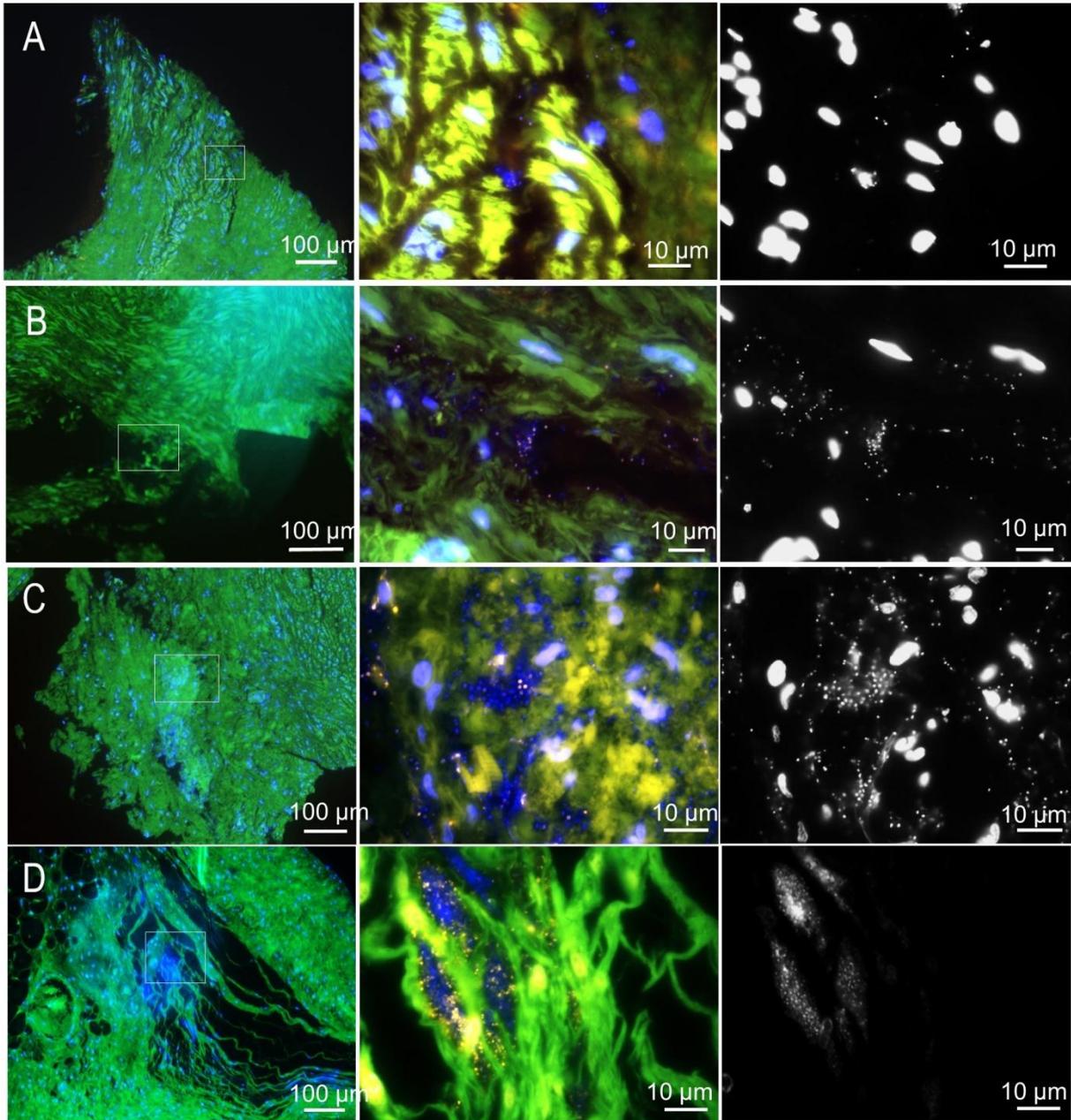
(A): Porcine Aortenwurzel, angenäht an einen Silikonring. Zustand vor dem Einsetzen und Betrieb im in vitro – Modell. (B): Porcine Aortenwurzel nach 40 h Betrieb im in vitro – Modell, Modell inkubiert mit *S. epidermidis* PIA 8400.

### 3.4.1 Etablierungsversuche

Die standardmäßige FISH zeigte in allen n=4 Etablierungsversuchen eine kokkoide Monobesiedlung und die exemplarische, spezifische FISH einer der Versuche identifizierte deren Gattung als Staphylokokken. In einer ebenfalls exemplarisch von einem Versuch durchgeführten PCR wurde die inokulierte Spezies *S. epidermidis* als verursachendes Pathogen der Besiedlung mit einer übereinstimmenden Sequenz von 99,81% über 515 Basenpaare nachgewiesen.

Die Besiedlung der Klappen manifestierte sich in allen möglichen morphologischen Formen. Das Spektrum reichte von einzelnen, adhärierenden Kokken über Mono- und Multilayer und Mikrokolonien bis hin zu manifesten Biofilmen. In allen Versuchen zeigte sich ein positives Cy3-Signal der ribosomalen 16S rRNA.

Ein qualitativer Vergleich der Besiedlungsmuster der n=4 Etablierungsversuche miteinander schien zu zeigen, dass die Besiedlung in Bezug auf Dicke und Invasivität von der Zeitdauer des Versuchs und der initialen, bakteriellen Titrierung des Modells beeinflussbar war. Das höhere Inokulum ( $1,5 \times 10^5$  CFU/ml im Vergleich zu  $1,5 \times 10^4$  CFU/ml) schien hierbei einen größeren Einfluss zu haben als die Versuchsdauer (24 h und 40 h). (Abb. 8) In Bezug auf Intensität der Besiedlung im Verhältnis zur Versuchsdauer zeigte folglich der Versuch mit dem höheren Inokulum und der kürzeren Versuchsdauer die beste Effizienz.



### Abbildung 8: Vergleich der bakteriellen Besiedlung der Etablierungsversuche via FISH

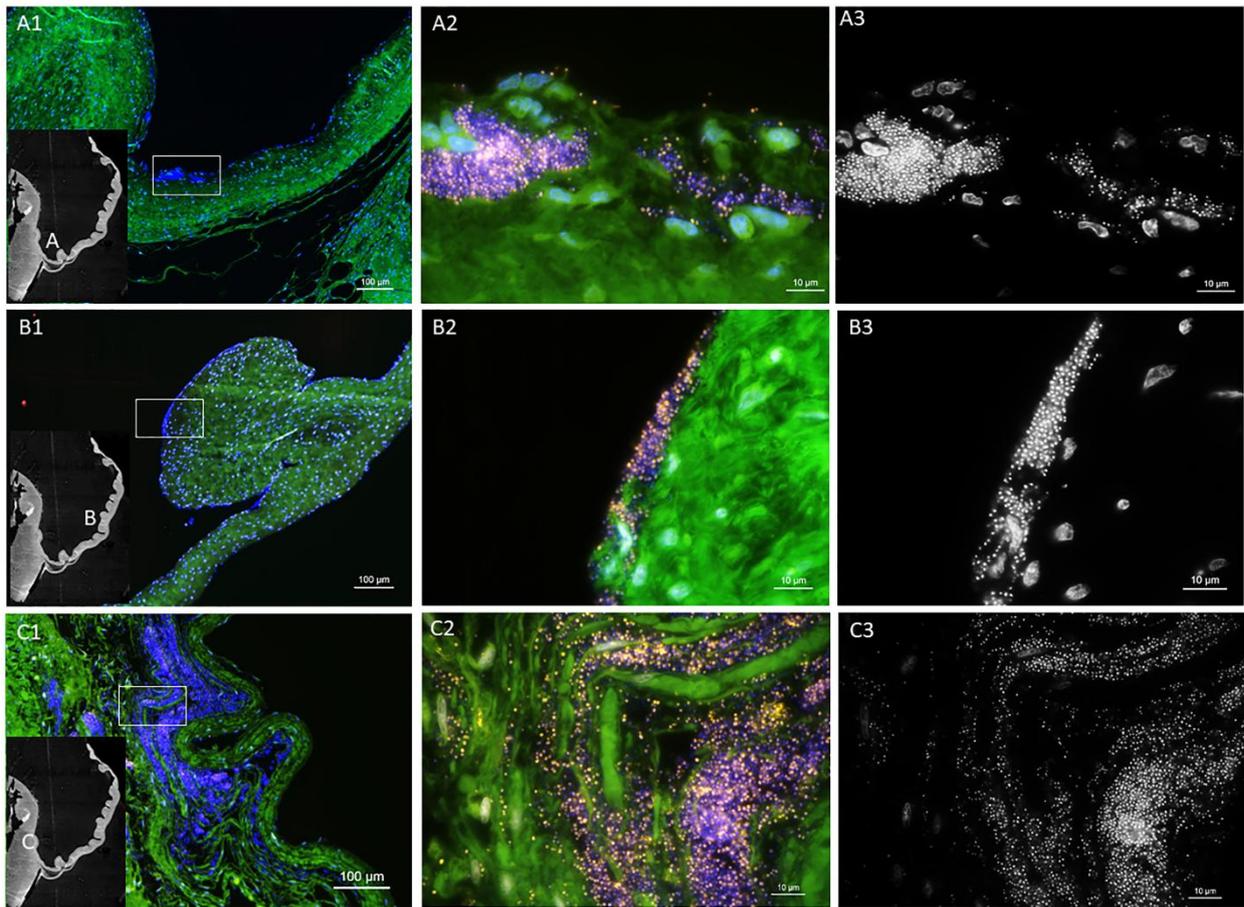
Die Etablierungsversuche wurden mittels FISH qualitativ untersucht. Jede Zeile des Panels beinhaltet jeweils Bilder eines Etablierungsversuchs. Die Bilder zeigen die standardmäßige FISH mit der panbakteriellen Sonde EUB338 in Cy3 (orange), der Nonsense-Sonde non-EUB338 in Cy5 (dunkelrot), dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI (blau) und dem grünen Gewebshintergrund (FITC). Die Spalten 1 und 2 zeigen jeweils die Summe aus allen Kanälen, Spalte 1 in 10-facher und Spalte 2 in 100-facher Vergrößerung. In Spalte 3 ist jeweils der Ausschnitt aus Spalte 2 in schwarz-weiß gezeigt, jedoch nur mit DAPI und Cy3, um so einen kontrastreichen Überblick über alle Kokken darzustellen. Die Bilder in Zeile A stammen aus dem Versuch mit einem initialen Inokulum von  $1,5 \times 10^4$  CFU/ml und 24 h Versuchsdauer, Zeile B  $1,5 \times 10^4$  CFU/ml und 40 h, Zeile C  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml und 24 h, Zeile D  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml und 40 h. In jeder Zeile ist eine kokkoide Besiedlung ohne Kontaminanten zu sehen. Innerhalb der Biofilme (Gesamtheit der Kokken durch DAPI blau) fallen Cy3-positive Kokken (orange) auf. Die gezeigten Ausschnitte zeigen bakterielle Biofilme, die über das Endothel in das Gewebe eingedrungen sind. Wie anhand dieser Ausschnitte exemplarisch demonstriert, schien die bakterielle Besiedlung der Aortenklappen in den Etablierungsversuchen durch die Höhe des Inokulums und die Versuchsdauer beeinflussbar. In Zusammenschau der Besiedlung jeweils der gesamten Schnitte entstand der Eindruck, dass das höhere Inokulum hierbei einen größeren Effekt zeigte als die Versuchsdauer.

### 3.4.2 Reproduktionsversuche

Auf die Etablierungsversuche folgten n=3 aufeinanderfolgende Versuche mit einer gleichen initialen Titrierung des Systems von  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml und einer Versuchsdauer von 24 h, um die Reproduktionsfähigkeit der in den Etablierungsversuchen erzeugten, bakteriellen Besiedlung zu untersuchen.

In allen drei Versuchen wurde mittels FISH eine kokkoide Monobesiedlung der Aortenwurzel nachgewiesen. Auch in allen Reproduktionsversuchen beinhaltete die Besiedlung ein positives Cy3-Signal der ribosomalen 16S rRNA. Eine wie zuvor in den Etablierungsversuchen exemplarisch an einem Versuch durchgeführte spezifische FISH zeigte, dass die Kokken ebenfalls der Gattung Staphylokokken angehörten und eine PCR identifizierte – ebenfalls wie zuvor in den Etablierungsversuchen – die inokulierte Spezies *S. epidermidis* als das verursachende Pathogen der nachgewiesenen Besiedlung. Die Sequenz der Probe stimmte hier über eine Länge von 508 Basenpaaren zu 99,94% mit der Vergleichssequenz überein.

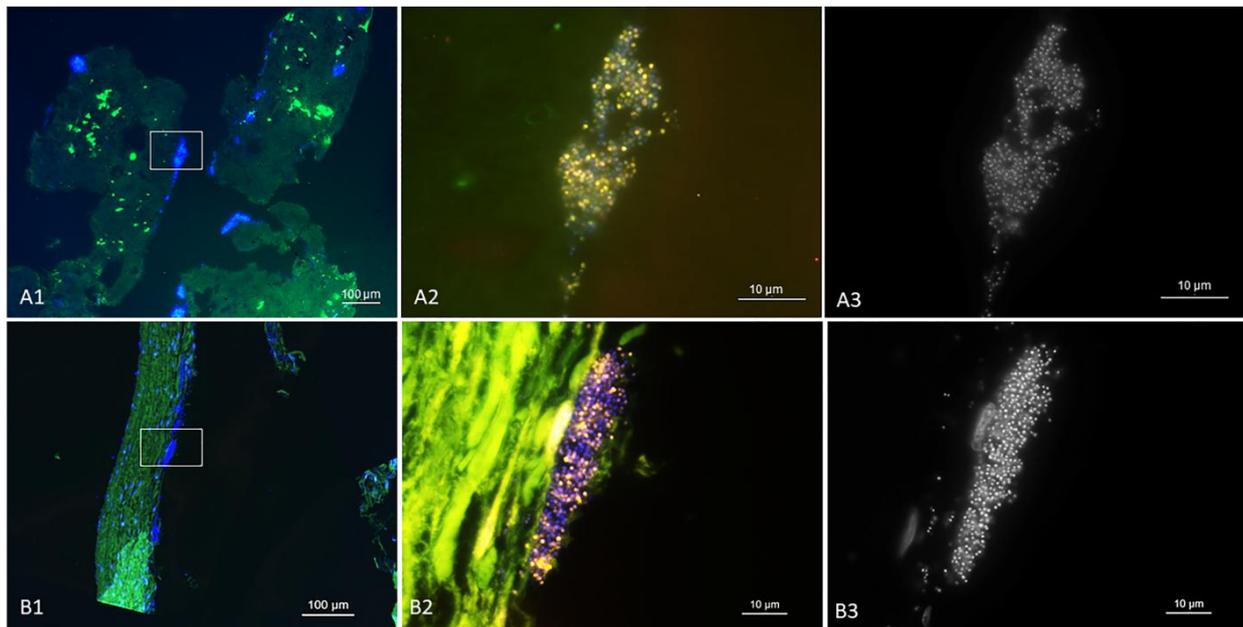
Das morphologische Spektrum der Besiedlung war ebenfalls mit dem der Etablierungsversuche identisch und auch in allen Reproduktionsversuchen wurden Kokken mit einem aktiven Stoffwechsel nachgewiesen. Der Vergleich der pro Versuch entnommenen 4 Proben (vgl. Abb. 4) miteinander bestätigte den Eindruck der Etablierungsversuche, dass die bakterielle Besiedlung in besonderem Maße die Taschen der Aortenklappe betraf. Insbesondere der freie Rand und die Taschenbasis wiesen hier eine im Vergleich besonders intensive Besiedlung auf. Dieses Besiedlungsmuster war bei allen n=3 Reproduktionsversuchen ähnlich. (Abb. 9) Die Biofilme an der Oberfläche der Taschen hatten eine Dicke von 2 bis 25  $\mu\text{m}$ . Es wurden auch invasive Biofilme basal des Endothels beobachtet. Sie reichten bis zum Stratum myoelasticum und teilweise sogar bis zur Tela subendocardialis, was von der luminalen Oberfläche aus gemessen einer maximalen Tiefe im Gewebe von 400  $\mu\text{m}$  entsprach. Die Dicke der invasiven Biofilme betrug 4 bis 100  $\mu\text{m}$ .



### Abbildung 9: Vergleich der bakteriellen Besiedlung der Semilunartaschen via FISH

Die Ausschnitte des Panels zeigen die Analyse der Reproduktionsversuche mittels standardmäßiger FISH mit der panbakteriellen Sonde EUB338 in Cy3 (orange), der Nonsense-Sonde non-EUB338 in Cy5 (dunkelrot), dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI (blau) und dem grünen Gewebshintergrund (FITC). In Zeile A, Zeile B und Zeile C wird jeweils ein Versuch mit einem Inokulum von  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml und einer Versuchsdauer von 24 h gezeigt. In jeder Zeile wurde Entnahmestelle 4 (vgl. Abb. 4), der Querschnitt durch die mediale Tasche, untersucht. Die Spalten 1 und 2 zeigen jeweils die Summe aus allen Kanälen, Spalte 1 in 10-facher und Spalte 2 in 100-facher Vergrößerung. In Spalte 1 ist zusätzlich die genaue Lokalisation des Ausschnittes auf der Tasche dargestellt. In Spalte 3 ist jeweils der Ausschnitt aus Spalte 2 in schwarz-weiß gezeigt, jedoch nur mit DAPI, um so einen kontrastreichen Überblick über alle Kokken darzustellen. Wie in den Etablierungsversuchen ist eine kokkoide Besiedlung ohne Kontaminanten zu sehen und in der durch DAPI blau gefärbten Gesamtheit der Kokken fallen durch die Bindung der Sonde EUB338 auch orange gefärbte Kokken im Biofilm auf. Die im Panel gezeigten Ausschnitte demonstrieren die Beobachtung aus der Analyse der gesamten Schnitte, dass in allen  $n=3$  Reproduktionsversuchen im Schnitt durch die Semilunartaschen eine Besiedlung von vergleichbarer Intensität und Konstanz stattfand. In besonderem Maße waren der Bereich der Basis und der freie Rand der Tasche besiedelt. Im Vergleich mit den anderen Entnahmestellen fiel auf, dass die Besiedlung an den Semilunartaschen am intensivsten war.

Die in den Reproduktionsversuchen seriell erzeugte, bakterielle Besiedlung der porcinen Aortenwurzeln wurde mit einem Besiedlungsmuster verglichen, das durch FISH-Analyse eines humanen, klinischen IE-Falles beobachtet wurde. (Abb. 10) Der Vergleich zeigte, dass das im in vitro – Kreislaufmodell auf porcinen Aortenwurzeln erzeugte Muster der bakteriellen Besiedlung mit dem Besiedlungsmuster einer humanen, klinischen IE übereinstimmt.



**Abbildung 10: Vergleich der bakteriellen Besiedlung der im in vitro – Kreislaufmodell erzeugten Biofilme mit einer klinischen Probe einer humanen IE**

Zeile A: Gewebprobe einer humanen Aortenklappenendokarditis mit *Staphylococcus aureus*, präoperativ antibiotisch behandelt. FISH mit der panbakteriellen Sonde EUB338 in Cy3 (orange), der Nonsense-Sonde non-EUB338 in Cy5 (dunkelrot) und dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI (blau). A1 zeigt alle Kanäle bei 10-facher Vergrößerung, die Oberflächen-assoziierten Biofilme imponieren blau. In der 100-fachen Vergrößerung (A2) zeigt der Ausschnitt einen heterogenen Biofilm aus DAPI-positiven und EUB338-positiven Kokken. Zur Verdeutlichung der Struktur in A3 lediglich das DAPI-Signal in schwarz-weiß.

Zeile B: Porcine Aortenklappe nach Betrieb im in vitro – Modell mit einer initialen Titration von  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml und einer Versuchsdauer von 24 h. Standardmäßige FISH mit der panbakteriellen Sonde EUB338 in Cy3 (orange), der Nonsense-Sonde non-EUB338 in Cy5 (dunkelrot), dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI (blau) und dem grünen Gewebshintergrund (FITC). In B1 alle Kanäle bei 10-facher Vergrößerung, in B2 alle Kanäle bei 100-facher Vergrößerung, B3 entspricht Spalte 2 jedoch wird hier nur DAPI in schwarz-weiß gezeigt. Die Struktur und Größe des Biofilms ist mit der der Zeile A vergleichbar.

## **4. Diskussion**

Die IE ist eine Erkrankung, deren Therapie weiterhin eine Herausforderung ist. Die Biofilme der IE sind gegen eine herkömmliche, systemische Antibiose häufig tolerant und daher therapierefraktär und viele der Patienten mit formaler OP-Indikation können tatsächlich nicht operiert werden. (s. Kap. 1.7) Es werden sowohl neue pharmakologische als auch operative Verfahren zur Therapie der IE benötigt. Da die Auswahl geeigneter Modelle zur Grundlagenforschung an der IE bisher eingeschränkt ist (s. Kap. 1.6), werden zur Evaluation neuer Therapieverfahren, insbesondere im Bereich der Klappenprothesen und Transkatheterklappen, zunächst geeignete Forschungsmodelle benötigt.

### **4.1 Bedeutung der Ergebnisse**

#### **4.1.1 Strömungsbedingungen**

Es wurde ein in vitro – Modell konstruiert, in dem porcine Aortenwurzeln in toto unter physiologischen hämodynamischen Strömungsbedingungen betrieben wurden. Entsprechend der Konzeption des Modells (s. Abb. 2, Kap. 2.1.1), nimmt die Aortenklappe im Modell ihre physiologische, trikuspide Funktion in vitro auf. (s. Abb. 5) Die Kolbenpumpe verdrängte pulsatile ein Schlagvolumen von 100 ml mit einer Frequenz von 50/min, was zu einem physiologischen Volumenstrom über die porcine Aortenklappe führte. Da das Schlagvolumen und die Herzfrequenz an der Kolbenpumpe frei einstellbar sind, lassen sich diese Parameter in weiteren Versuchen der jeweiligen Fragestellung anpassen. Die durchgeführte Druckmessung im aortalen Kompartiment des Modells ergab während des Betriebes einen diastolischen Druck von bis zu 78 mmHg, was als physiologischer Druck gegen die geschlossene Aortenklappe einzustufen ist. Da der systolische Druck im Modell negativ war, sind die Drücke im Modell faktisch nur eine Näherung an die physiologische Drucksituation in der humanen Aorta. Die Druckverhältnisse sind in diesem Modell, das eine bakterielle Besiedlung der Aortenwurzel zum Ziel hat, jedoch von nicht entscheidender Bedeutung. Denn für die Biofilmbildung von Einfluss und daher für deren Simulation an der Aortenwurzel entscheidend ist in erster Linie der Fluss über die Klappe. (58, 128, 129) Da im in vitro – Modell der Fluss über die Aortenklappe physiologisch ist, wurde gewährleistet, dass die Erreger der simulierten Bakteriämie im Modell zur Adhäsion und Proliferation an der Klappe einer vergleichbaren Strömungssituation ausgesetzt sind wie im humanen Organismus. Der pulsatile Fluss sorgt für eine stetige Durchmischung des Mediums im Modell und die Strömung versorgt den Biofilm unabhängig vom herrschenden Druck fortwährend mit neuen Nährstoffen. Ein weiterer

strömungsabhängiger Faktor, der einen Einfluss auf die Biofilmbildung hat, ist die Wandschubspannung. (129, 130) Die Wandschubspannung ist die wichtigste strömungsbedingte Kraft, die direkt auf die Endothelzellen wirkt. Auch die Wandschubspannung ist unabhängig vom herrschenden Druck, sondern wird vor allem von der Flussgeschwindigkeit der Strömung beeinflusst. (131) Demzufolge ist die Wandschubspannung im in vitro – Modell vergleichbar mit der, wie sie an humanen Aortenklappen auftritt. Es ist zwar nicht gänzlich auszuschließen, dass auch der Druck einen Einfluss auf die bakterielle Besiedlung haben könnte. So ist beispielsweise ein hoher negativer Druck von bis zu -200 mmHg zur supportativen Therapie von Biofilmen von infektiösen Wundheilungsstörungen Bestandteil aktueller Forschungsvorhaben. (132, 133) Es handelt sich in diesen Projekten jedoch um einen langfristigen, konstanten Druck und die Übertragbarkeit auf das in vitro – Modell scheint fraglich, auch da die absoluten Druckwerte im Kreislaufmodell (systolisch ca. -20 mmHg) deutlich geringer sind. Abschließend wird der Einfluss der Druckverhältnisse im Kreislaufmodell auf die Biofilmbildung als sehr geringfügig und daher als vernachlässigbar gewertet. Alle für die Biofilmbildung relevanten Strömungsparameter sind in dem gezeigten in vitro – Modell der IE physiologisch.

#### **4.1.2 Mikrobielle Isolation des Modells zur Umgebung**

Die Sterilitätstests haben gezeigt, dass innerhalb des Modells kein mikrobielles Wachstum stattfindet, wenn es mit sterilem Kulturmedium betrieben wird. Die Sterilitätstests fanden wie alle anderen Versuche im selben Inkubatorschrank, d.h. einer unsterilen Umgebung statt. Daraus folgt, dass während des Aufbaus und des Betriebs des Modells keine Mikroorganismen in dasselbe gelangt sind und das Modell somit eine von der Umwelt isolierte Wachstumsumgebung für die Biofilmversuche zur Verfügung stellt. Auch auf den verwendeten Aortenwurzeln konnten nach der Analyse mit FISH und der Inkubation in TSB-Boullion keine aktiven Mikroorganismen nachgewiesen werden. Dementsprechend ist das Modell als ganzes bis zu dem Zeitpunkt der Inokulation des Pathogens steril.

Diese Schlussfolgerungen wurden dadurch bestätigt, dass in allen insgesamt n=7 Versuchen zur Biofilmerzeugung ausschließlich die Monobesiedlung mit dem inokulierten *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen wurde. Die standardmäßige FISH zeigte in allen Versuchen eine kokkoide Monobesiedlung und durch ein positives Signal der Sonde STAPH der spezifischen FISH wurde die Gattung der Kokken als *Staphylococcus* identifiziert. Das negative Signal der Sonde SAU, die *S. aureus* detektiert, schloss dabei eine mögliche Kontamination mit anderen Staphylokokken weitestgehend aus. Um den unwahrscheinlichen Fall einer Kontamination mit anderen Staphylokokken als dem Hautkeim *S. aureus* dennoch auszuschließen, wurden

zusätzlich zwei PCR durchgeführt. Beide PCR identifizierten dabei den Erreger der Besiedlung als den inokulierten *S. epidermidis* und bestätigten damit die Schlussfolgerung.

Zusammenfassend wurde demonstriert, dass mit dem entwickelten in vitro – Modell das Wachstum von Biofilmen auf porcinen Aortenwurzeln ausschließlich von ausgewählten, in das Modell inokulierten Pathogenen möglich ist.

### **4.1.3 Biofilmbildung**

#### **4.1.3.1 Etablierungsversuche**

Die Etablierungsversuche zeigten, dass ausnahmslos der in das System inokulierte Erreger die Herzklappen mit einem breiten morphologischen Spektrum besiedelte. Die qualitativ bestimmte Intensität der Besiedlung war von der Höhe des bakteriellen Inokulums und der Versuchsdauer beeinflussbar. Die Steigerung der Titration von  $1,5 \times 10^4$  auf  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml schien hierbei einen größeren Einfluss auszuüben als die Verlängerung der Versuchsdauer von 24 auf 40 h. Es ist bekannt, dass das Wachstum von Mikroorganismen von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie z.B. dem Nährstoffangebot, der Bewegung des Mediums und schließlich der Spezies selbst. (54, 130, 134, 135) Für Staphylokokken wurden in vitro verhältnismäßig kurze Verdopplungszeiten von ca. 20-60 min für die planktonische Vermehrung in TSB mit Dextrose beobachtet. (136, 137) In der Annahme, dass im Kreislaufmodell hierfür eine Rate von 60 min herrschte, müsste daher der Unterschied der initialen Titrierung von einer Zehnerpotenz spätestens nach 4 h Inkubation im Modell überwunden worden sein. D.h. folglich wäre der Versuch mit  $1,5 \times 10^4$  CFU/ml über 40 h effektiv 12 h länger bei der gleichen planktonischen Titrierung des Modells inkubiert gewesen als der Versuch mit  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml über 24 h und es wäre hier im Vergleich ein größerer Einfluss der verlängerten Versuchsdauer zu erwarten gewesen. Tatsächlich bleibt dies jedoch nur ein Gedankenexperiment, da die Änderung der CFU-Konzentration über die Zeit im Modell nicht gemessen wurde. Die zitierte Verdopplungszeit ist außerdem nur als grobe Abschätzung anzusehen, da Gottenbos et al. und Domingue et al. nicht exakt den gleichen Stamm bzw. Spezies verwenden, das Wachstum in TSB mit Dextrose stattfindet und auch weitere Wachstumsbedingungen nicht auf das Kreislaufmodell übertragbar sind. (136, 137) Des Weiteren ist generell fraglich, inwiefern die bloße Konzentration der planktonischen Bakterien überhaupt im Zusammenhang mit der Entstehung der oberflächenassoziierten Biofilme in vitro steht. Das Wachstum von *S. epidermidis* auf Oberflächen kann bis zu drei Mal schneller sein als das planktonische Wachstum. (136) So könnte durch eine verlängerte Versuchsdauer eine zu hohe Konzentration der planktonischen Erreger im Medium durch erhöhten Nährstoffverbrauch zu einer

Behinderung des Biofilmwachstums auf der Aortenklappe geführt haben. Letztendlich sind die Mechanismen für den beobachteten Einfluss jedoch unbekannt.

Des Weiteren ist die Versuchszahl von jeweils einem Versuch pro Inokulum und Zeitdauer zu gering, um überhaupt eine signifikante Aussage über die Abhängigkeit der Biofilmbildung von den genannten Parametern treffen zu können. Die qualitative Beobachtung, dass die Biofilmbildung der Etablierungsversuche im Kreislaufmodell mehr von dem erhöhten Inokulum als von der Versuchsdauer beeinflussbar war, kann daher grundsätzlich nur als Eindruck bewertet werden.

#### **4.1.3.2 Reproduktionsversuche**

Auch die seriellen  $n=3$  Reproduktionsversuche bestätigten die Kontaminationsfreiheit des Modells. (vgl. Kap. 4.1.2) Mit den Reproduktionsversuchen sollte untersucht werden, ob unter gleichen Betriebsbedingungen vergleichbare Besiedlungsmuster auf den Aortenwurzeln entstanden. Um orientierend Prädispositionsstellen für die Biofilmbildung zu identifizieren, wurden alle vier Entnahmestellen (s. Abb. 4) via FISH miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass vor allem die Taschen der Klappen vergleichsweise intensiv besiedelt waren und dort das qualitative Gesamtbild der Besiedlung und die manuell gemessene Dicke und Invasivität der Biofilme im Mittel in allen  $n=3$  Versuchen untereinander ähnlich und konsistent waren. Jedoch bleibt diese Analyseform trotz der manuellen Messung insgesamt nur qualitativ und erreicht nicht die objektive Aussagekraft einer echten Quantifizierung. Da pro Probe nur ein Schnitt ausgewertet wurde, kann außerdem keine Aussage über den räumlichen Verlauf der Biofilme über die Probe getroffen werden.

Dennoch ist das im Kreislaufmodell beobachtete Besiedlungsmuster qualitativ mit dem einer klinischen, humanen IE vergleichbar. Die Ausbildung der verschiedenen Morphologien von einzelnen adhärierenden Kokken bis hin zu manifesten Biofilmen, deren Invasivität teilweise fast bis in das Myokard reichte, demonstriert, dass in dem Modell die Pathomechanismen der Biofilmbildung wie bakterielle Adhäsion, Proliferation, EPS – Synthese, folglich die Biofilmbildung selbst und die Infiltration des Gewebes stattfanden. (54, 138) Eine bakterielle Infiltration basal des Endothels wird in humanen IE – Fällen ebenfalls beobachtet. (91, 95) Nicht nur in den Reproduktionsversuchen, sondern in allen  $n=7$  Versuchen wurde ein positives Cy3-Signal der ribosomalen 16S rRNA beobachtet. Dies wies aufgrund der ribosomalen Aktivität auf Bakterien mit einem aktiven Stoffwechsel hin. (92, 94, 139) Cluster dieser aktiven Kokken und Bereiche im Biofilm mit inaktiveren Kokken deuteten auf die komplexe Strukturierung innerhalb des Biofilms hin, wie sie im Menschen beobachtet wird. (91, 138, 140) Auch die Beobachtung,

dass insbesondere die Taschen selbst von der Besiedlung betroffen waren, gleicht den Befunden einer humanen IE. (51)

## 4.2 Limitationen

Das präsentierte Kreislaufmodell erzeugt zwar unter physiologischer humaner Hämodynamik eine bakterielle Besiedlung auf Aortenwurzeln in toto und das mit einem nachgewiesenen vergleichbarem Muster einer humanen IE, aber da es ein in vitro – Modell ist bleibt es dennoch nur eine Annäherung an die Besiedlung in vivo. Der größte Unterschied zur Situation in vivo ist das Fehlen von Immunfaktoren eines lebenden Organismus. TSB stellt in dem Modell das Blut dar und die Aortenwurzeln wurden in Glutaraldehyd fixiert. Es fehlen daher alle humoralen und zellulären Abwehrmechanismen des Immunsystems. Eine weitere Konsequenz des Ersatzes des Blutes mit TSB ist das Fehlen von Thrombozyten und Fibrin. Entsprechend konnte keine Bildung von Vegetationen beobachtet werden, da diese essentiellen Bestandteile derselben nicht vorhanden waren. Weiterhin unterscheidet sich die Nährstoffzusammensetzung des TSB ohne Dextrose und auch die Viskosität von der des humanen Blutes.

Die initiale Titrierung des Modells von  $1,5 \times 10^4$  bis  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml entspricht denen von zuvor publizierten in vitro – und in vivo – Modellen. Es werden in beiden Fällen Inokula von  $1 \times 10^3$  CFU/ml bis  $1 \times 10^9$  CFU/ml verwendet. (36, 37, 102, 103, 111) Der Verlauf dieser Titrierung unterscheidet sich jedoch sehr zwischen beiden Modellarten, da in vivo – Modelle über ein intaktes Immunsystem verfügen. So zeigen Veloso et al., dass im in vivo – Modell bereits nach 2 h ein Bolus von  $10^5$  CFU nicht mehr im Blut nachweisbar sein kann. (141) In in vitro – Modellen ist dagegen aufgrund ungehinderter Wachstumsmöglichkeit eine Steigerung der planktonischen Erregerkonzentration zu erwarten. Die hier und in den zitierten Modellen verwendete Titrierung ist vermutlich um ein Vielfaches höher als die Konzentration einer Bakteriämie im Menschen. In einer Studie, in der die Bakteriämie nach dentalen Eingriffen gemessen wurde, zeigt sich eine maximale Konzentration von 10 CFU/ml. (142) Die im Modell gewählte Titration entspricht folglich am ehesten einer sehr hochgradigen Bakteriämie. Ein interessanter Lösungsvorschlag, um eine klinische Bakteriämie in vivo besser zu simulieren, besteht in einer kontinuierlichen Injektion des Inokulums. (141) Eventuell könnte dieses Verfahren auch die Näherung des Kreislaufmodells an die Situation in vivo weiter verbessern.

Trotz der vorhandenen Limitationen des Modells ist zusammenfassend festzuhalten, dass die Näherung an die in vivo – Situation in dem vergestellten in vitro – Modell im Vergleich zu bisher publizierten in vitro – Modellen der IE von einer neuen Qualität ist.

### **4.3 Fazit**

Das in dieser Arbeit präsentierte Modell ist das erste in vitro – Kreislaufmodell der infektiösen Endokarditis, das in vitro die mikrobielle Besiedlung einer Aortenklappe in toto mit ausgewählten Mikroorganismen unter einer physiologischen Hämodynamik ermöglicht. Das Modell simuliert mit einer bisher einzigartigen Nähe und Vergleichbarkeit eine humane IE in vitro. Insbesondere für die initiale Erprobung von neuartigen Therapieverfahren stellt dieses Modell eine wesentlich zeit- und kostengünstigere Alternative zu in vivo – Modellen dar.

### **4.4 Ausblick**

Das vorgestellte Kreislaufmodell bietet eine neue Forschungsgrundlage zur Erforschung der IE. Der Einsatz des Modells ist in verschiedenen Forschungsschwerpunkten möglich. Zum einen ist das Modell zur mikrobiologischen Analyse der Biofilmbildung geeignet. Durch die serielle Erzeugung von Biofilmen ausgewählter Erreger verspricht das System neue Einblicke in die Pathogenese der IE zu gewähren. So sind beispielsweise Erkenntnisse über die Lokalisation von Prädilektionsstellen der bakteriellen Adhäsion an der Klappe und des Biofilmwachstums insgesamt denkbar, sowie die Formation und Aktivität der Pathogene im Biofilm. Durch die Möglichkeit verschiedenartige Kreislaufsituationen in dem Modell zu simulieren, lässt sich außerdem der Einfluss von Strömung auf die Bildung von Biofilmen an der Aortenklappe untersuchen.

Zum anderen ist das Modell für die Evaluation von sowohl pharmakologischen als auch operativen und katheterbasierten Therapieverfahren geeignet. Vor allem für Letzteres scheint es in besonderem Maße geeignet zu sein. Denkbar ist zum Beispiel die Evaluation von therapeutischen und präventiven Device Coatings. Da der Betrieb verschiedener Klappenformen wie biologischer und mechanischer Prothesen und von Transkatheterklappen in dem Modell möglich ist, können verschiedenartige, beschichtete Devices erprobt werden. Im Vergleich zu in vivo – Modellen ist das in vitro – Kreislaufmodell für eine erste Erprobung solcher Devices womöglich interessanter, da es einen deutlich geringeren personellen und finanziellen Aufwand benötigt. Das hier präsentierte Modell könnte daher als Grundlage dienen und ein Anreiz dafür sein, um innovative Verfahren zur Therapie der IE zu entwickeln und dadurch deren Prognose nachhaltig zu verbessern.

#### **4.4.1 Evaluation antimikrobiell beschichteter Transkatheterklappen**

Da rund ein Viertel der IE – Patienten trotz Operationsindikation nicht operiert werden kann (114) (vgl. Kap. 1.7), ist die Entwicklung von neuen Therapieverfahren für diese Patientengruppe notwendig. Die Implantation einer antiinfektiv beschichteten Transkatheterklappe mit Wirkstoffreservoir könnte ein neues, die Prognose verbesserndes Therapieverfahren für Patienten mit Aortenklappenendokarditis sein. Hierbei würde die Transkatheterklappe wie beim chirurgischen Herzklappenersatz eine physiologische Aortenklappenfunktion wiederherstellen und das topische Antiinfektivaeservoir würde direkt lokal antimikrobiell auf den Biofilm der IE wirken und so zusätzlich zur systemischen antibiotischen Therapie die Eradikation der Erreger unterstützen.

Um eine erste Evaluation der Machbarkeit dieser Idee durchzuführen, wurde ein antiinfektiv beschichteter Stent entwickelt, der zur Implantation in eine Aortenwurzel geeignet ist. Er wurde im vorgestellten in vitro – Modell in eine porcine Aortenwurzel implantiert, die zuvor im Modell bakteriell besiedelt wurde. (Abb. 11) Der Stent wurde mit einem Polyglycerol beschichtet. (143) Beladen wurde das Coating zunächst mit Vancomycin. Die Beladung ist mit verschiedenen Wirkstoffen möglich. In zukünftigen Versuchen ist die Prüfung verschiedener Antibiotika einzeln oder in Kombination oder auch die Prüfung anderer antimikrobieller Wirkstoffe denkbar, z.B. Kupfer-Nanopartikel. (143)

Die in dieser Arbeit geleistete Entwicklung und Etablierung des in vitro – Kreislaufmodells der IE soll als Grundlage dienen, um eine Machbarkeitsstudie der Idee einer antiinfektiven Transkatheterklappe durchzuführen.



**Abbildung 11: Erster Test eines antiinfektiv beschichteten Stents als Pilotprojekt zur Evaluation der Machbarkeit einer antiinfektiv beschichteten Transkatheterklappe zur Therapie der IE**

Eine wie beschrieben behandelte porcine Aortenwurzel (s. Kap. 2.2-2.4) wurde mit einer initialen Titrierung von  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml für 24 h im in vitro – Kreislaufmodell inkubiert. Für den späteren Vergleich wurde eine Probe der Aortenwurzel entnommen und in FishFix fixiert. Anschließend wurde ein zuvor angefertigter Stent manuell in die Aortenwurzel implantiert. Um die Auflagefläche für die Beschichtung zu vergrößern, wurde zirkulär in Glutaraldehyd fixiertes, bovines Perikard an den Stent angenäht. Die Beschichtung des Stents erfolgte mit Polyglycerol (143) und dessen Beladung mit 500 mg Vancomycin gelöst in PBS. Die Aortenwurzel samt Stent wurde in ein autoklaviertes, zweites Kreislaufmodell eingesetzt und wiederum für 6 h bei einem HMV von 5 l betrieben. Hierbei wurde ein im Verhältnis 1:2 mit zwei Teilen PBS verdünntes TSB verwendet.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Martinovic M, Figulla HR, Lauten A. CRT-700.58 A Pulsatile In Vitro-model of Infective Endocarditis. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 26. Februar 2018;11(4 Supplement):S65.
2. Martinovic M, Kursawe L, Affeld K, Kikhney J, Moter A, Lauten A. Beitrag V140, 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung vom 4. bis 7. April 2018 in Mannheim. *Clin Res Cardiol*. April 2018;107(S1):1–1.
3. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe HH, Moch H, Herausgeber. *Pathologie: mit rund 150 Tabellen; [Plus im Web, mediscript]*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2012. 1064 S.
4. Lüllmann-Rauch R, Asan E. *Taschenbuch Histologie*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2015. 726 S.
5. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, Viebahn C. *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik*. 6. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2013. 615 S.
6. Dow DR, Harper WF. The Vascularity of the Valves of the Human Heart. *J Anat*. Juli 1932;66(Pt 4):610–7.
7. Duran CM, Gunning AJ. The vascularization of the heart valves: a comparative study. *Cardiovasc Res*. Juli 1968;2(3):290–6.
8. Weind KL, Boughner DR, Rigutto L, Ellis CG. Oxygen diffusion and consumption of aortic valve cusps. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1. Dezember 2001;281(6):H2604–11.
9. Herold G, Herausgeber. *Innere Medizin 2018*. Köln; 2018.
10. Mylonakis E, Calderwood SB. Infective Endocarditis in Adults. *New England Journal of Medicine*. 1. November 2001;345(18):1318–30.
11. Bin Abdulhak AA, Baddour LM, Erwin PJ, Hoen B, Chu VH, Mensah GA, Tleyjeh IM. Global and Regional Burden of Infective Endocarditis, 1990–2010: A Systematic Review of the Literature. *Global Heart*. 1. März 2014;9(1):131–43.
12. Moreillon P, Que Y-A. Infective endocarditis. *The Lancet*. 10. Januar 2004;363(9403):139–49.
13. Delahaye F, Goulet V, Lacassin F, Ecochard R, Selton-Suty C, Hoen B, Etienne J, Briçon S, Leport C. Characteristics of infective endocarditis in France in 1991. A 1-year survey. *Eur Heart J*. März 1995;16(3):394–401.

14. Nissen H, Nielsen PF, Frederiksen M, Helleberg C, Nielsen JS. Native valve infective endocarditis in the general population: a 10-year survey of the clinical picture during the 1980s. *Eur Heart J*. Juli 1992;13(7):872–7.
15. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, Karchmer AW, Olaison L, Pappas PA, Moreillon P, Chambers ST, Chu VH, Falcó V, Holland DJ, Jones P, Klein JL, Raymond NJ, Read KM, Tripodi MF, Utili R, Wang A, Woods CW, Cabell CH. Clinical Presentation, Etiology and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century: The International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 9. März 2009;169(5):463–73.
16. Holland TL, Baddour LM, Bayer AS, Hoen B, Miro JM, Fowler VG. Infective endocarditis. *Nat Rev Dis Primers*. 1. September 2016;2:16059.
17. Rabinovich S, Evans J, Smith IM, January LE. A LONG-TERM VIEW OF BACTERIAL ENDOCARDITIS. 337 CASES 1924 TO 1963. *Ann Intern Med*. August 1965;63:185–98.
18. Sy RW, Kritharides L. Health care exposure and age in infective endocarditis: results of a contemporary population-based profile of 1536 patients in Australia. *Eur Heart J*. August 2010;31(15):1890–7.
19. Watt G, Lacroix A, Pachirat O, Baggett HC, Raoult D, Fournier P-E, Tattevin P. Prospective comparison of infective endocarditis in Khon Kaen, Thailand and Rennes, France. *Am J Trop Med Hyg*. April 2015;92(4):871–4.
20. Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, Corey GR, Spelman D, Bradley SF, Barsic B, Pappas PA, Anstrom KJ, Wray D, Fortes CQ, Anguera I, Athan E, Jones P, van der Meer JT, Elliott TS, Levine DP, Bayer AS; ICE Investigators. *Staphylococcus aureus* Endocarditis: A Consequence of Medical Progress. *JAMA*. 22. Juni 2005;293(24):3012–21.
21. Strom BL, Abrutyn E, Berlin JA, Kinman JL, Feldman RS, Stolley PD, Levison ME, Korzeniowski OM, Kaye D.. Risk factors for infective endocarditis: oral hygiene and nondental exposures. *Circulation*. 5. Dezember 2000;102(23):2842–8.
22. Heimdahl A, Hall G, Hedberg M, Sandberg H, Söder PO, Tunér K, Nord CE. Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *J Clin Microbiol*. Oktober 1990;28(10):2205–9.
23. Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*. Juni 2006;33(6):401–7.
24. Lucas VS, Gafan G, Dewhurst S, Roberts GJ. Prevalence, intensity and nature of bacteraemia after toothbrushing. *J Dent*. Juli 2008;36(7):481–7.
25. Strom BL, Abrutyn E, Berlin JA, Kinman JL, Feldman RS, Stolley PD, Levison ME, Korzeniowski OM, Kaye D. Dental and cardiac risk factors for infective endocarditis. A population-based, case-control study. *Ann Intern Med*. 15. November 1998;129(10):761–9.

26. Seymour RA, Lowry R, Whitworth JM, Martin MV. Infective endocarditis, dentistry and antibiotic prophylaxis; time for a rethink? *Br Dent J*. 9. Dezember 2000;189(11):610–6.
27. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, Bolger A, Cabell CH, Takahashi M, Baltimore RS, Newburger JW, Strom BL, Tani LY, Gerber M, Bonow RO, Pallasch T, Shulman ST, Rowley AH, Burns JC, Ferrieri P, Gardner T, Goff D, Durack DT. 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*. 9. Oktober 2007;116(15):1736–54.
28. Greenspon AJ, Patel JD, Lau E, Ochoa JA, Frisch DR, Ho RT, Pavri BB, Kurtz SM. 16-year trends in the infection burden for pacemakers and implantable cardioverter-defibrillators in the United States 1993 to 2008. *J Am Coll Cardiol*. 30. August 2011;58(10):1001–6.
29. Chirouze C, Cabell CH, Fowler VG, Khayat N, Olaison L, Miro JM, Habib G, Abrutyn E, Eykyn S, Corey GR, Selton-Suty C, Hoen B; International Collaboration on Endocarditis Study Group. Prognostic factors in 61 cases of *Staphylococcus aureus* prosthetic valve infective endocarditis from the International Collaboration on Endocarditis merged database. *Clin Infect Dis*. 1. Mai 2004;38(9):1323–7.
30. Frontera JA, Gradon JD. Right-side endocarditis in injection drug users: review of proposed mechanisms of pathogenesis. *Clin Infect Dis*. Februar 2000;30(2):374–9.
31. Hecht SR, Berger M. Right-sided endocarditis in intravenous drug users. Prognostic features in 102 episodes. *Ann Intern Med*. 1. Oktober 1992;117(7):560–6.
32. Miró JM, del Río A, Mestres CA. Infective endocarditis in intravenous drug abusers and HIV-1 infected patients. *Infect Dis Clin North Am*. Juni 2002;16(2):273–95, vii–viii.
33. Manoff SB, Vlahov D, Herskowitz A, Solomon L, Muñoz A, Cohn S, Willoughby SB, Nelson KE. Human immunodeficiency virus infection and infective endocarditis among injecting drug users. *Epidemiology*. November 1996;7(6):566–70.
34. 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.
35. Federspiel JJ, Stearns SC, Peppercorn AF, Chu VH, Fowler VG. Endocarditis Trends in the United States Demonstrate Increasing Rates of *Staphylococcus aureus*: 1999–2008. *Arch Intern Med*. 27. Februar 2012;172(4):363–5.
36. Durack DT, Beeson PB, Petersdorf RG. Experimental bacterial endocarditis. 3. Production and progress of the disease in rabbits. *Br J Exp Pathol*. April 1973;54(2):142–51.
37. Durack DT, Beeson PB. Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation. *Br J Exp Pathol*. Februar 1972;53(1):44–9.

38. Gould K, Ramirez-Ronda CH, Holmes RK, Sanford JP. Adherence of bacteria to heart valves in vitro. *J Clin Invest.* Dezember 1975;56(6):1364–70.
39. 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.
40. Vercellotti GM, McCarthy JB, Lindholm P, Peterson PK, Jacob HS, Furcht LT. Extracellular matrix proteins (fibronectin, laminin, and type IV collagen) bind and aggregate bacteria. *Am J Pathol.* Juli 1985;120(1):13–21.
41. Scheld WM, Strunk RW, Balian G, Calderone RA. Microbial adhesion to fibronectin in vitro correlates with production of endocarditis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med.* Dezember 1985;180(3):474–82.
42. Scheld WM, Calderone RA, Alliegro GM, Sande MA. Yeast adherence in the pathogenesis of *Candida* endocarditis. *Proc Soc Exp Biol Med.* November 1981;168(2):208–13.
43. Ellis ME, Al-Abdely H, Sandridge A, Greer W, Ventura W. Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. *Clin Infect Dis.* Januar 2001;32(1):50–62.
44. Gross L, Friedberg CK. NONBACTERIAL THROMBOTIC ENDOCARDITIS: CLASSIFICATION AND GENERAL DESCRIPTION. *Arch Intern Med (Chic).* 1. Oktober 1936;58(4):620–40.
45. Yao J, Bone RC, Sawhney RS. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha on the expression of fibronectin and collagen genes in cultured bovine endothelial cells. *Cell Mol Biol Res.* 1995;41(1):17–28.
46. Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun.* Dezember 1986;54(3):833–6.
47. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, François P, Vaudaux P. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun.* Dezember 1995;63(12):4738–43.
48. Yao L, Berman JW, Factor SM, Lowy FD. Correlation of histopathologic and bacteriologic changes with cytokine expression in an experimental murine model of bacteremic *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun.* September 1997;65(9):3889–95.
49. Durack DT. Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions. *J Pathol.* Februar 1975;115(2):81–9.
50. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG Jr, Tleyjeh IM, Rybak MJ, Barsic B, Lockhart PB, Gewitz MH, Levison ME, Bolger AF, Steckelberg JM, Baltimore RS, Fink AM, O'Gara P, Taubert KA; American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia,

and Stroke Council. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 13. Oktober 2015;132(15):1435–86.

51. Fernández Guerrero ML, Álvarez B, Manzarbeitia F, Renedo G. Infective endocarditis at autopsy: a review of pathologic manifestations and clinical correlates. *Medicine (Baltimore)*. Mai 2012;91(3):152–64.
52. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 21. Mai 1999;284(5418):1318–22.
53. Elgharably H, Hussain ST, Shrestha NK, Blackstone EH, Pettersson GB. Current Hypotheses in Cardiac Surgery: Biofilm in Infective Endocarditis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. Spring 2016;28(1):56–9.
54. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*. Mai 2013;(136):1–51.
55. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. April 2002;15(2):167–93.
56. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:357–72.
57. Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, Schaefer AL. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*. Dezember 1997;179(23):7530–7.
58. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. September 2002;8(9):881.
59. Parsek MR, Singh PK. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*. 2003;57(1):677–701.
60. Ferguson DJ, McColm AA, Ryan DM, Acred P. A morphological study of experimental staphylococcal endocarditis and aortitis. II. Inter-relationship of bacteria, vegetation and cardiovascular in established infections. *Br J Exp Pathol*. Oktober 1986;67(5):679–86.
61. Marrie TJ, Cooper JH, Costerton JW. Ultrastructure of cardiac bacterial vegetations on native valves with emphasis on alterations in bacterial morphology following antibiotic treatment. *Can J Cardiol*. September 1987;3(6):275–80.
62. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti F, Dulgheru R, El Khoury G, Erba PA, Iung B, Miro JM, Mulder BJ, Plonska-Gosciniak E, Price S, Roos-Hesselink J, Snygg-Martin U, Thuny F, Tornos Mas P, Vilacosta I, Zamorano JL; ESC Scientific Document Group. 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). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*. 21. November 2015;36(44):3075–128.

63. Alagna L, Park LP, Nicholson BP, Keiger AJ, Strahilevitz J, Morris A, Wray D, Gordon D, Delahaye F, Edathodu J, Miró JM, Fernández-Hidalgo N, Nacinovich FM, Shahid R, Woods CW, Joyce MJ, Sexton DJ, Chu VH. Repeat endocarditis: analysis of risk factors based on the International Collaboration on Endocarditis - Prospective Cohort Study. *Clin Microbiol Infect.* Juni 2014;20(6):566–75.
64. Koegelenberg CFN, Doubell AF, Orth H, Reuter H. Infective endocarditis: improving the diagnostic yield. *Cardiovasc J S Afr.* Februar 2004;15(1):14–20.
65. Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Juni 2006;47(1):1–13.
66. Croft CH, Woodward W, Elliott A, Commerford PJ, Barnard CN, Beck W. Analysis of surgical versus medical therapy in active complicated native valve infective endocarditis. *Am J Cardiol.* Juni 1983;51(10):1650–5.
67. Kang D-H, Kim Y-J, Kim S-H, Sun BJ, Kim D-H, Yun S-C, Song J-M, Choo SJ, Chung C-H, Song J-K, Lee J-W, Sohn D-W. Early surgery versus conventional treatment for infective endocarditis. *N Engl J Med.* 28. Juni 2012;366(26):2466–73.
68. Mourvillier B, Trouillet J-L, Timsit J-F, Baudot J, Chastre J, Régnier B, Gibert C, Wolff M. Infective endocarditis in the intensive care unit: clinical spectrum and prognostic factors in 228 consecutive patients. *Intensive Care Med.* November 2004;30(11):2046–52.
69. 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.
70. Bayer AS, Ward JI, Ginzton LE, Shapiro SM. Evaluation of new clinical criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Am J Med.* März 1994;96(3):211–9.
71. Hoen B, Selton-Suty C, Danchin N, Weber M, Villemot JP, Mathieu P, Floquet J, Canton P. Evaluation of the Duke criteria versus the Beth Israel criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* Oktober 1995;21(4):905–9.
72. Hoen B, Béguinot I, Rabaud C, Jaussaud R, Selton-Suty C, May T, Canton P. The Duke criteria for diagnosing infective endocarditis are specific: analysis of 100 patients with acute fever or fever of unknown origin. *Clin Infect Dis.* August 1996;23(2):298–302.
73. Cecchi E, Parrini I, Chinaglia A, Pomari F, Brusasco G, Bobbio M, Trincherò R, Brusca A. New diagnostic criteria for infective endocarditis. A study of sensitivity and specificity. *Eur Heart J.* Juli 1997;18(7):1149–56.
74. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, Bashore T, Corey GR. Proposed Modifications to the Duke Criteria for the Diagnosis of Infective Endocarditis. *Clin Infect Dis.* 1. April 2000;30(4):633–8.

75. 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.
76. Erbel R, Rohmann S, Drexler M, Mohr-Kahaly S, Gerharz CD, Iversen S, Oelert H, Meyer J. 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.
77. Daniel WG, Mügge A, Martin RP, Lindert O, Hausmann D, Nonnast-Daniel B, Laas J, Lichtlen PR. Improvement in the diagnosis of abscesses associated with endocarditis by transesophageal echocardiography. *N Engl J Med*. 21. März 1991;324(12):795–800.
78. Hekimian G, Kim M, Passefort S, Duval X, Wolff M, Leport C, Leplat C, Steg G, lung B, Vahanian A, Messika-Zeitoun D. Preoperative use and safety of coronary angiography for acute aortic valve infective endocarditis. *Heart*. Mai 2010;96(9):696–700.
79. Feuchtner GM, Stolzmann P, Dichtl W, Schertler T, Bonatti J, Scheffel H, Mueller S, Plass A, Mueller L, Bartel T, Wolf F, Alkadhi H. Multislice computed tomography in infective endocarditis: comparison with transesophageal echocardiography and intraoperative findings. *J Am Coll Cardiol*. 3. Februar 2009;53(5):436–44.
80. Fagman E, Perrotta S, Bech-Hanssen O, Flinck A, Lamm C, Olaison L, Svensson G. ECG-gated computed tomography: a new role for patients with suspected aortic prosthetic valve endocarditis. *Eur Radiol*. November 2012;22(11):2407–14.
81. Snygg-Martin U, Gustafsson L, Rosengren L, Alsiö A, Ackerholm P, Andersson R, Olaison L. 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*. 1. Juli 2008;47(1):23–30.
82. Cooper HA, Thompson EC, Laureno R, Fuisz A, Mark AS, Lin M, Goldstein SA. Subclinical brain embolization in left-sided infective endocarditis: results from the evaluation by MRI of the brains of patients with left-sided intracardiac solid masses (EMBOLISM) pilot study. *Circulation*. 18. August 2009;120(7):585–91.
83. Bryan RN, Levy LM, Whitlow WD, Killian JM, Preziosi TJ, Rosario JA. Diagnosis of acute cerebral infarction: comparison of CT and MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. August 1991;12(4):611–20.
84. Goulenok T, Klein I, Mazighi M, Messika-Zeitoun D, Alexandra JF, Mourvillier B, Laissy JP, Leport C, lung B, Duval X; IMAGE study group. Infective endocarditis with symptomatic cerebral complications: contribution of cerebral magnetic resonance imaging. *Cerebrovasc Dis*. 2013;35(4):327–36.
85. Duval X, lung B, Klein I, Brochet E, Thabut G, Arnoult F, Lepage L, Laissy JP, Wolff M, Leport C; IMAGE (Resonance Magnetic Imaging at the Acute Phase of Endocarditis) Study Group. 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.

86. Houplikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine (Baltimore)*. Mai 2005;84(3):162–73.
87. Raoult D, Casalta JP, Richet H, Khan M, Bernit E, Rovey C, Branger S, Gouriet F, Imbert G, Bothello E, Collart F, Habib G. Contribution of systematic serological testing in diagnosis of infective endocarditis. *J Clin Microbiol*. Oktober 2005;43(10):5238–42.
88. Fournier P-E, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta J-P, Arzouni J-P, Maurin M, Célard M, Mainardi J-L, Caus T, Collart F, Habib G, Raoult D. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis*. 15. Juli 2010;51(2):131–40.
89. Madico GE, Rice PA. 16S-Ribosomal DNA to diagnose culture-negative endocarditis. *Curr Infect Dis Rep*. Juli 2008;10(4):280–6.
90. 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*. Juni 2009;28(6):569–73.
91. Moter A, Musci M, Schmiedel D. Molecular methods for diagnosis of infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep*. Juli 2010;12(4):244–52.
92. Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods*. Juli 2000;41(2):85–112.
93. Wagner M, Horn M, Daims H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol*. Juni 2003;6(3):302–9.
94. Santos Ferreira I, Kikhney J, Kursawe L, Kasper S, Gonçalves LMD, Trampuz A, Moter A, Bettencourt AF, Almeida AJ. Encapsulation in Polymeric Microparticles Improves Daptomycin Activity Against Mature Staphylococci Biofilms-a Thermal and Imaging Study. *AAPS PharmSciTech*. Mai 2018;19(4):1625–36.
95. Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D, Petrich A, Gescher DM, Halle E, Musci M, Hetzer R, Göbel UB, Moter A. Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study. *Clin Microbiol Infect*. Juni 2010;16(6):767–73.
96. Tornos P, lung B, Permanyer-Miralda G, Baron G, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Butchart EG, Ravaud P, Vahanian A. Infective endocarditis in Europe: lessons from the Euro heart survey. *Heart*. Mai 2005;91(5):571–5.
97. de Kerchove L, Vanoverschelde J-L, Poncelet A, Glineur D, Rubay J, Zech F, Noirhomme P, El Khoury G. Reconstructive surgery in active mitral valve endocarditis: feasibility, safety and durability. *Eur J Cardiothorac Surg*. April 2007;31(4):592–9.
98. de Kerchove L, Price J, Tamer S, Glineur D, Momeni M, Noirhomme P, El Khoury G. Extending the scope of mitral valve repair in active endocarditis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. April 2012;143(4 Suppl):S91-95.

99. Aymami M, Revest M, Piau C, Chabanne C, Le Gall F, Lelong B, Verhoye JP, Michelet C, Tattevin P, Flécher E. Heart transplantation as salvage treatment of intractable infective endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* April 2015;21(4):371.e1-4.
100. Macneal WJ, Spence MJ, Wasseen M. Experimental production of endocarditis lenta. *Am J Pathol.* November 1939;15(6):695-706.3.
101. Loewe L, Rosenblatt P, Lederer M. Experimental Thrombotic Bacterial (Streptococcus Viridans) Endocarditis: I. Its Production and Incidence in the Rabbit. *Am J Pathol.* Januar 1944;20(1):89–93.
102. Wang M, Zhang Y, Fan M, Guo Y, Ren W, Luo E. A rabbit model of right-sided Staphylococcus aureus endocarditis created with echocardiographic guidance. *Cardiovasc Ultrasound.* 14. Januar 2013;11:3.
103. Hershberger E, Coyle EA, Kaatz GW, Zervos MJ, Rybak MJ. Comparison of a Rabbit Model of Bacterial Endocarditis and an In Vitro Infection Model with Simulated Endocardial Vegetations. *Antimicrob Agents Chemother.* Juli 2000;44(7):1921–4.
104. Becker RC, DiBello PM, Lucas FV. Bacterial tissue tropism: an in vitro model for infective endocarditis. *Cardiovasc Res.* November 1987;21(11):813–20.
105. Bryers JD, Hendricks S. Bacterial infection of biomaterials. Experimental protocol for in vitro adhesion studies. *Ann N Y Acad Sci.* 31. Dezember 1997;831:127–37.
106. Kharazmi A, Giwercman B, Høiby N. Robbins device in biofilm research. *Meth Enzymol.* 1999;310:207–15.
107. Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM. Acceleration of Enterococcus faecalis biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PLoS ONE.* 30. Dezember 2010;5(12):e15798.
108. Leuck A-M, Johnson JR, Dunny GM. A widely used in vitro biofilm assay has questionable clinical significance for enterococcal endocarditis. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e107282.
109. McGrath BJ, Kang SL, Kaatz GW, Rybak MJ. Bactericidal activities of teicoplanin, vancomycin, and gentamicin alone and in combination against Staphylococcus aureus in an in vitro pharmacodynamic model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* September 1994;38(9):2034–40.
110. Kang SL, Rybak MJ. Pharmacodynamics of RP 59500 alone and in combination with vancomycin against Staphylococcus aureus in an in vitro-infected fibrin clot model. *Antimicrob Agents Chemother.* Juli 1995;39(7):1505–11.
111. Mercier R-C, Rybak MJ, Bayer AS, Yeaman MR. Influence of Platelets and Platelet Microbicidal Protein Susceptibility on the Fate of Staphylococcus aureus in an In Vitro Model of Infective Endocarditis. *Infect Immun.* August 2000;68(8):4699–705.

112. Werth BJ, Barber KE, Ireland CE, Rybak MJ. Evaluation of ceftaroline, vancomycin, daptomycin, or ceftaroline plus daptomycin against daptomycin-nonsusceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model of simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother.* Juni 2014;58(6):3177–81.
113. Yim J, Smith JR, Singh NB, Rice S, Stamper K, Garcia de la Maria C, Bayer AS, Mishra NN, Miró JM, Tran TT, Arias CA, Sullam P, Rybak MJ. Evaluation of daptomycin combinations with cephalosporins or gentamicin against *Streptococcus mitis* group strains in an in vitro model of simulated endocardial vegetations (SEVs). *J Antimicrob Chemother.* 01 2017;72(8):2290–6.
114. Chu VH, Park LP, Athan E, Delahaye F, Freiburger T, Lamas C, Miro JM, Mudrick DW, Strahilevitz J, Tribouilloy C, Durante-Mangoni E, Pericas JM, Fernández-Hidalgo N, Nacinovich F, Rizk H, Krajinovic V, Giannitsioti E, Hurley JP, Hannan MM, Wang A; International Collaboration on Endocarditis (ICE) Investigators. Association between surgical indications, operative risk, and clinical outcome in infective endocarditis: a prospective study from the International Collaboration on Endocarditis. *Circulation.* 13. Januar 2015;131(2):131–40.
115. Polysulfon - Polytron Kunststofftechnik [Internet]. [zitiert 5. Oktober 2018]. Verfügbar unter: <https://www.polytron-gmbh.de/polysulfon.aspx>
116. Lauten A, Figulla HR, Willich C, Jung C, Rademacher W, Schubert H, Ferrari M. Heterotopic valve replacement as an interventional approach to tricuspid regurgitation. *J Am Coll Cardiol.* 2. Februar 2010;55(5):499–500.
117. Lauten A, Laube A, Schubert H, Bischoff S, Nietzsche S, Horstkötter K, Poudel-Bochmann B, Franz M, Lichtenberg A, Figulla HR, Akhyari P. Transcatheter treatment of tricuspid regurgitation by caval valve implantation--experimental evaluation of decellularized tissue valves in central venous position. *Catheter Cardiovasc Interv.* 1. Januar 2015;85(1):150–60.
118. Lee JM, Boughner DR, Courtman DW. The glutaraldehyde-stabilized porcine aortic valve xenograft. II. Effect of fixation with or without pressure on the tensile viscoelastic properties of the leaflet material. *J Biomed Mater Res.* Januar 1984;18(1):79–98.
119. Goldemund A. In vitro Endothelialisierung glutaraldehydfixierter porciner Herzklappen [Internet] [Dissertation]. Ludwig-Maximilians-Universität München; 2005 [zitiert 2. Oktober 2018]. Verfügbar unter: <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/5125/>
120. Willich C. Der perkutane Trikuspidalklappenersatz: Untersuchung eines minimal-invasiven Verfahrens zur Behandlung der Trikuspidalinsuffizienz. [Internet] [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena; 2014 [zitiert 2. Oktober 2018]; Verfügbar unter: [https://www.db-thueringen.de/receive/dbt\\_mods\\_00024297](https://www.db-thueringen.de/receive/dbt_mods_00024297)
121. Mack D, Siemssen N, Laufs R. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun.* Mai 1992;60(5):2048–57.

122. Charitos EI, Sievers H-H. Anatomy of the aortic root: implications for valve-sparing surgery. *Ann Cardiothorac Surg*. Januar 2013;2(1):53–6.
123. Moter A, Leist G, Rudolph R, Schrank K, Choi BK, Wagner M, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology (Reading, Engl)*. September 1998;144 ( Pt 9):2459–67.
124. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*. Juni 1990;56(6):1919–25.
125. Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*. 1993;14(2):136–43.
126. Trebesius K, Leitritz L, Adler K, Schubert S, Autenrieth IB, Heesemann J. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. *Med Microbiol Immunol*. Juni 2000;188(4):169–75.
127. Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol*. Februar 2000;38(2):830–8.
128. Rijnaarts HH, Norde W, Bouwer EJ, Lyklema J, Zehnder AJ. Bacterial Adhesion under Static and Dynamic Conditions. *Appl Environ Microbiol*. Oktober 1993;59(10):3255–65.
129. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol*. Juni 2002;13(3):228–33.
130. Teodósio JS, Simões M, Melo LF, Mergulhão FJ. Flow cell hydrodynamics and their effects on *E. coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. *Biofouling*. Januar 2011;27(1):1–11.
131. Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*. 29. August 2007;362(1484):1445–57.
132. Jafari M, Desmond P, van Loosdrecht MCM, Derlon N, Morgenroth E, Picioreanu C. Effect of biofilm structural deformation on hydraulic resistance during ultrafiltration: A numerical and experimental study. *Water Res*. 18. August 2018;145:375–87.
133. Guoqi W, Zhirui L, Song W, Tongtong L, Lihai Z, Licheng Z, Peifu T. Negative pressure wound therapy reduces the motility of *Pseudomonas aeruginosa* and enhances wound healing in a rabbit ear biofilm infection model. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111(9):1557–70.

134. Coultas MK, Hutchison DJ. Metabolism of resistant mutants of *Streptococcus faecalis*. IV. Use of a biophotometer in growth-curve studies. *J Bacteriol.* September 1962;84:393–401.
135. Jäger S, Mack D, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JK-M. Disintegration of *Staphylococcus epidermidis* biofilms under glucose-limiting conditions depends on the activity of the alternative sigma factor sigmaB. *Appl Environ Microbiol.* September 2005;71(9):5577–81.
136. Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ. Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res.* Mai 2000;50(2):208–14.
137. Domingue G, Costerton JW, Brown MR. Bacterial doubling time modulates the effects of opsonisation and available iron upon interactions between *Staphylococcus aureus* and human neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 31. Dezember 1996;16(3–4):223–8.
138. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Høiby N, Moser C, Costerton JW, Møter A, Bjarnsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Juli 2012;65(2):127–45.
139. Poulsen LK, Ballard G, Stahl DA. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl Environ Microbiol.* Mai 1993;59(5):1354–60.
140. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* März 2008;6(3):199–210.
141. Veloso TR, Amiguet M, Rousson V, Giddey M, Vouillamoz J, Moreillon P, Entenza JM. Induction of experimental endocarditis by continuous low-grade bacteremia mimicking spontaneous bacteremia in humans. *Infect Immun.* Mai 2011;79(5):2006–11.
142. Heimdahl A, Hall G, Hedberg M, Sandberg H, Söder PO, Tunér K, Nord CE. Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *J Clin Microbiol.* Oktober 1990;28(10):2205–9.
143. Li M, Gao L, Schlaich C, Zhang J, Donskyi IS, Yu G, Li W, Tu Z, Rolff J, Schwerdtle T, Haag R, Ma N. Construction of Functional Coatings with Durable and Broad-Spectrum Antibacterial Potential Based on Mussel-Inspired Dendritic Polyglycerol and in Situ-Formed Copper Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 11. Oktober 2017;9(40):35411–8.

## 6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marc Martinović, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema ‚Etablierung eines pulsatilen in vitro – Modells der infektiösen Endokarditis als neue Forschungsgrundlage zur Evaluation therapeutischer und präventiver Device Coatings‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 7. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Herr Marc Martinović hatte folgenden Anteil an den folgenden zur Veröffentlichung eingereichten Forschungsarbeiten:

Alexander Lauten<sup>#</sup>, Marc Martinović<sup>#</sup>, Laura Kursawe, Judith Kikhney, Klaus Affeld, Ulrich Kertzsch, Volkmar Falk, Annette Moter. Bacterial Biofilms in Infective Endocarditis – An in vitro - Model to Investigate Emerging Technologies of Antimicrobial Cardiovascular Device Coatings, Clinical Research in Cardiology, 22. Mai 2020

(<sup>#</sup> Diese Autoren leisteten einen gleichwertigen Beitrag zur Veröffentlichung)

- Mitarbeit in der Planung und Konzeption des Projektes
- Mitarbeit in der Entwicklung des Kreislaufmodells
- Entwicklung des Versuchsprotokolls
- Durchführung aller Versuche inkl. Probenasservierung
- Mitarbeit in der mikroskopischen Auswertung (FISH)
- Autor aller im Manuskript enthaltenen Kapitel
- Einreichen des Manuskripts, Corresponding Author

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **8. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 9. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Alexander Lauten für die Initiierung und Bereitstellung des Projektes und dieser Dissertation bedanken. Vielen Dank für eine konstruktive und ideelle Unterstützung, eine unkomplizierte Erreichbarkeit und dem stetig hohen Interesse an dieser Arbeit.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Frau PD Dr. Annette Moter und Frau Dr. Judith Kikhney, Biofilmzentrum des DHZB, für die Kooperation in diesem Projekt. Vielen Dank für das Vertrauen, von Beginn an selbstständig mikrobiologisch arbeiten zu dürfen und der Unterstützung bei der Umsetzung der Experimente und Verbesserung der Methodik. Für die zur Verfügung gestellten Laboratorien und die Auswertung der Proben durch FISH und PCR gilt mein besonderer Dank.

Auch bedanke ich mich bei Frau Laura Kursawe, M. Sc. für die engagierte Mitarbeit und praktische Unterstützung des Projektes, insbesondere für die Durchführung der FISH sowie der Hilfe bei allen möglichen Fragen über das mikrobiologische Arbeiten und die Methodik im Labor.

Weiterhin gilt mein Dank den Herren Prof. Dr. Klaus Affeld und Dr. Ullrich Kertzsch, Labor für Biofluidmechanik, Charité für die Konstruktion des Prototypen und Herrn Lederer, LB Engineering, Berlin für die konstruktive Weiterentwicklung des Modells.

Ebenfalls danke ich der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit durch die Vergabe des Otto-Hess-Promotionsstipendiums an mich.

***Besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Bildungslaufbahn auch meinen Eltern Sylvia und Mišo Martinović danken – für Alles.***