

**Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**Diagnose der Infektiösen Endokarditis mittels
Fluoreszenz in situ Hybridisierung**

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

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin**

von

Christian Mallmann

aus Frankfurt/Main

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel
2. Univ.-Prof. Dr. L. H. Wieler
3. Priv.-Doz. Dr. K Heuner

Datum der Promotion: 05.06.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	
1.1	Kurzfassung	4
1.2	Einleitung	5
1.3	Methodik	7
1.4	Ergebnisse	9
1.5	Diskussion	11
1.6	Limitationen	13
1.7	Schlussfolgerung	14
1.8	Ausblick	14
1.9	Literaturverzeichnis	16
2.	Erklärung über den Anteil an den Publikationen	19
3.	Druckexemplare	21
3.1	Mallmann C. et al. Clinical Microbiology and Infection. 2010 Jun;16(6):767-73. Epub 2009 Aug 20.	
3.2.	Gescher DM et al. Int J Antimicrob Agents. 2008 Nov;32 Suppl 1:S51-9. Epub 2008 Aug 20	
3.3	Gescher DM et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Jan;60(1):99-103. Epub 2007 Sep 21.	
4.	Lebenslauf	22
5.	Publikationsliste	23
6.	Erklärung über die Eigenständigkeit	24
7.	Danksagung	25

1 Zusammenfassung

1.1 Kurzzusammenfassung

Diese Publikationspromotion setzt sich aus drei Veröffentlichungen zur molekularen Diagnostik der Infektiösen Endokarditis (IE) bzw. Sepsis mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zusammen [1-3]. Die FISH ist eine molekularbiologische Methode, bei der Mikroorganismen kulturunabhängig durch fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden mikroskopisch dargestellt werden.

Sowohl IE als auch Sepsis sind mit einer hohen Mortalität verbunden und bedürfen einer zielgerichteten Therapie. Die dafür notwendige genaue Identifizierung des ursächlichen Erregers gelingt aber durch die etablierten, kulturbasierten Routinemethoden häufig nicht. Das liegt zum einen an schwer kultivierbaren Erregern, zum anderen an der häufig bereits vor der Diagnosestellung begonnenen Antibiotikatherapie. Initial wurde ein Set aus FISH-Sonden entwickelt und evaluiert, das die häufigsten Gram-positiven Sepsiserreger innerhalb von 3 Stunden zuverlässig identifizieren kann [1]. In einem zweiten Schritt konnte am klinisch unklaren Fall einer durch *B. quintana* verursachten Endokarditis bewiesen werden, dass die Diagnose der IE durch schwer kultivierbare Erreger mittels FISH an Gewebsschnitten möglich ist [2]. Das FISH-Sondenpanel für die Sepsisdiagnostik stand somit für den Nachweis von Erregern an Herzklappen zur Verfügung. Darüber hinaus wurden weitere Sonden entwickelt bzw. modifiziert, die neben den typischen auch seltenere IE-verursachende Erreger wie z.B. *Granulicatella adiacens* oder *Tropheryma whipplei* erfassen. In einer Pilotstudie konnte bei 26 von 54 Patienten eine IE mittels FISH diagnostiziert werden [3]. Darunter waren 5 kultur-negative und 10 fragliche Fälle, bei denen mittels FISH zweifelsfrei die ursächlichen Bakterien im Gewebe identifiziert werden konnten. Aufgrund der erfreulichen Ergebnisse dieser Pilotstudie wird FISH in unserem Haus bereits ergänzend zur Routinediagnostik der IE in ausgewählten Fällen genutzt und trägt zu einem verbesserten Patienten-Management bei.

1.2 Einleitung

Die Infektiöse Endokarditis (IE) ist eine seltene aber lebensbedrohliche Erkrankung verursacht durch eine Besiedlung der Herzklappen oder des Endokards mit Bakterien oder Pilzen. Aktuell wird eine Mortalität zwischen 15 und 33% berichtet [4-7]. Die IE entwickelt sich normalerweise auf dem Boden vorbestehender struktureller Herzschäden im Zusammenspiel mit einer Bakteriämie [8, 9]. Die häufigsten Veränderungen sind hierbei angeborene Herzfehler, rheumatische Herzerkrankungen, Herzklappenverkalkungen oder endovaskuläre Prothesen [10, 11]. Eine Bakteriämie kann spontan auftreten oder durch lokale bzw. systemische Infektionen wie Sepsis, urogenitale Infektionen oder eine Lungenentzündung [1]. In den letzten Jahrzehnten kam es zudem zu einem Wandel der Epidemiologie der Endokarditis, weil die ursächliche Bakteriämie zunehmend häufig durch diagnostische oder therapeutische Maßnahmen verursacht wird. Die vermehrte Verwendung invasiver Methoden chirurgischer oder zahnärztlicher Art sowie Hämodialyse und intravenöse Katheter tragen zu einem erhöhten Risiko einer IE bei [10]. Nicht zu vernachlässigen sind auch die Folgen des Missbrauchs intravenöser Drogen [12-14]. Die Diagnose der IE ist immer noch schwierig und setzt sich aus klinischen, bildmorphologischen, mikrobiologischen und histopathologischen Befunden zusammen. Konventionelle mikrobiologische Methoden versagen häufig bei der Bestätigung der Verdachtsdiagnose IE, selbst wenn klinische Beurteilung und Bildgebung hoch verdächtig sind [15]. Um den diagnostischen Prozess zu vereinheitlichen und zu vereinfachen, wurden standardisierte Algorithmen wie das modifizierte Duke-Schema entwickelt [16, 17]. Hierbei werden genau definierte Haupt- und Nebenkriterien genutzt, um den jeweiligen Fall entweder als sichere oder mögliche Endokarditis zu klassifizieren. Aufgrund der vielen unklaren Fälle trotz dringender Verdachtsdiagnose oder nach operativer Sanierung wird allgemein eine Weiterentwicklung der Diagnostik gefordert.

Ein wichtiges Kriterium des Duke-Schemas ist der mehrfache Nachweis des Pathogens in Blutkulturen. Sowohl bei der Sepsis als auch bei der IE ist die schnelle Erkennung und Identifizierung der Erreger Grundvoraussetzung für die rechtzeitige und genaue Diagnose. Durch die Identifikation der Spezies kann eine zielgerichtete antibiotische Therapie ermöglicht werden und Antibiotikaresistenzen vermieden werden. Darüber hinaus ist die schnellere Genesung nicht nur der Patient, sondern auch zu Kosteneinsparungen durch die Verkürzung der Zeit der Krankenhausbehandlung [18].

Bei positivem Wachstumssignal in den Blutkulturflaschen erfolgt in der mikrobiologischen Routinediagnostik momentan ein Grampräparat zur groben Einordnung des Erregers mit nachfolgender Kultivierung über Nacht und biochemischer Differenzierung [12, 19, 20]. So

werden bis zur endgültigen Speziesdifferenzierung in der Regel 1-2 Tage benötigt. Allerdings bleiben die Blutkulturen aufgrund einer vorangegangenen Antibiotika-Therapie oder anderer unklarer Ursachen häufig ohne Wachstum. Zusätzlich werden vermeintlich seltenere Organismen wie z.B. die HACEK-Gruppe, *Bartonella* spp., *Brucella* spp., *Abiotrophia* spp oder *Coxiella burnetii* nicht erfasst, obwohl ihnen in aktuellen Studien eine wichtige Rolle bescheinigt wird und eine Rate von 5 - 30% von kultur-negativen Endokarditiden beschrieben wird [2, 5, 15, 21-24].

In den letzten Jahren wurden verschiedene Strategien entwickelt um diese Rate zu senken. Häufig wurden molekulare Methoden wie die PCR mit anschließender Sequenzierung zur IE Diagnostik aus Herzklappenmaterial genutzt [21, 25-27]. Alle Studien belegen hierbei eine hohe Sensitivität in der Erregerdiagnostik und somit eine potentielle Verbesserung des Patienten-Managements. Aktuell ist jedoch noch umstritten, ob diese Methodik in die modifizierten Duke Klassifikation integriert werden soll, weil es erhebliche Einschränkungen aufgrund von falsch positiven Befunden bei Kontaminationen und falsch negativen bei Inhibitoren im Blut oder Herzklappengewebe gibt [19]. Weiterhin fehlt bislang eine Standardisierung dieser molekularbiologischen Methoden und sie bleibt daher spezialisierten Laboratorien vorbehalten.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erlaubt gleichzeitig Visualisierung, Identifikation und Lokalisierung von einzelnen Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung [28]. Das Prinzip der FISH von Bakterien beruht auf der spezifischen Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden an ihre Zielsequenz, meist ribosomale RNA, im morphologisch intakten Mikroorganismus. Sie findet breite Anwendung bei umfassenden mikrobiologischen Fragestellungen in Umwelt- und Biotechnologie sowie in der Human- und Veterinärmedizin und wird zunehmend auch zu diagnostischen Zwecken in der medizinischen Mikrobiologie eingesetzt [29-35].

So wurde ein Sondenpanel für die Identifikation Gram-positiver Kokken für die zeitnahe Diagnostik positiver Blutkulturen entwickelt. Dieses Panel deckte auch die häufigsten Endokarditiserreger ab und stand somit für die Erregersuche an Herzklappengewebe zur Verfügung.

In der Endokarditis-Studie wurden die resizierten Herzklappen von 54 Patienten mit sicherer oder möglicher Endokarditis mittels FISH untersucht und die Ergebnisse mit denen der konventionellen Standarddiagnostik durch Kultivierung verglichen. Dabei wurden das Sonden-Set erweitert und optimiert, so dass es geeignet ist, Bakterien zu identifizieren, die für ca. 90% aller Fälle von IE verantwortlich sind [1, 5, 20]. Ziel war die bakterielle Kolonisierung insbesondere von kultur-negativen Herzklappen mittels FISH zu beweisen und gleichzeitig die Erreger zu identifizieren.

1.3 Methode

1.3.1 Patientengruppen

Für die Sepsisdiagnostik wurden aus den vier Standorten der Charité zwischen Januar und Oktober 2003 428 aerobe und anaerobe Blutkulturflaschen von Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose eines Sepsissyndroms gesammelt und ausgewertet.

In die Endokarditis-Studie wurden 54 Patienten eingeschlossen, die im Zeitraum zwischen Januar 2003 und Januar 2004 wegen gesicherter oder klinisch vermuteter IE in der Charité (CCM) operiert wurden. Die Versuche wurden verblindet durchgeführt und die Ergebnisse dann retrospektiv mit den Resultaten der Routinediagnostik verglichen. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde zusätzlich PCR und anschließende RNA Sequenzierung durchgeführt.

1.3.2 Blutkulturen

Die Blutkulturflaschen wurden bei 36°C in einem automatisierten, kontinuierlich auslesenden System zur Detektion von bakteriellem Wachstum inkubiert. In Fällen von bakteriellem Wachstum wurden für die Gramfärbung, für Routine-Subkultivierung, für FISH und für PCR/Sequenzierung jeweils Aliquots entnommen. Die Subkultivierung auf Agar-Platten wurde entsprechend den konventionellen Identifikationsstandards der Charité durchgeführt.

1.3.3 Herzklappen

Das Herzklappengewebe wurde zeitnah nach Resektion fixiert und dann in Kaltpolymer eingebettet. Anschließend wurden mit einem Mikrotom Gewebeschnitte gefertigt. Dabei wurde ein im Haus etabliertes Protokoll genutzt [30].

1.3.4 Entwicklung des Sonden-Sets

Während der Projektplanung für die Sepsisdiagnostik mittels FISH wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um Oligonukleotidsonden zu identifizieren, die das Potential haben die typischen Sepsis- und Endokarditis-auslösenden Bakterien zu erfassen. Zusätzlich wurden neue Sonden entwickelt, um diagnostische Lücken zu schließen (Tabelle 1). Hierbei wurden Spezies-spezifische Sequenzabschnitte der 16S rRNA identifiziert und auf ihre Tauglichkeit als Sonden geprüft. In den Vorversuchen wurden diese Sonden getestet und evaluiert [1]. Die Sonden wurden mit allen verfügbaren 16S- Sequenzen in der EMBL und der GenBank Datenbank mit Hilfe des Programmes HUSAR (German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany) und des Ribosomal Database Project (RDP, Michigan State University) verglichen [36]. Dabei wurden auch phylogenetisch nah verwandte Erreger identifiziert, um geeignete Negativkontrollen zu erhalten. Negativ- und Positivkontrollen wurden bei allen Versuchen zur Gewährleistung der Spezifität benutzt.

Tabelle 1. Sondenübersicht

Sonde	Spezifität	Referenz
EUB338	Meiste der bekannten Bakterienspezies	[37]
nonEUB338	Keine der bekannten Bakterienspezies	[38]
STAPHY	<i>Staphylococcus</i> spp.	[39]
SAU	<i>S. aureus</i>	[29]
STREP1 ^a	<i>Streptococcus</i> spp., außer denen, die durch STREP2 detektiert werden	[39]
STREP2	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. peroris</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. gordonii</i> (<i>S. mitis</i> -Gruppe)	Diese Studie
ENCO	<i>Enterococcus</i> spp., außer <i>E. faecalis</i>	Diese Studie
FMDUR	<i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i>	[40]
EFAEC	<i>E. faecalis</i> , <i>E. sulfureus</i> , <i>Granulicatella</i> spp.	[41]
RE-WHIP3	<i>T. whipplei</i>	[42] und diese Studie
GRANU	<i>Granulicatella adiacens</i> , <i>G. para-adiacens</i> , <i>G. elegans</i> , <i>G. balaenopterae</i> , <i>Abiotrophia defectiva</i> , <i>Lactobacillus coleohominis</i> (<i>Granulicatella</i> -Gruppe)	Diese Studie
BAQU	<i>Bartonella quintana</i>	Diese Studie

1.3.5 FISH

Aufgrund des hohen Anteils gram-positiver Erreger wurde eine Vorbehandlung mit 1mg/mL Lysozym (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) und 1mg/mL Lysostaphin (Sigma-Aldrich) über einen Zeitraum von 15 Minuten eingeführt, um eine spätere Penetration der Oligonucleotidsonden zu ermöglichen. Die Kontrollen wurden wie vorbeschrieben fixiert. Der Hybridisierungspuffer setzte sich aus 0.9M NaCl, 20mM TrisHCl (pH 7.3) und 0.01% Natriumdodecylsulfat (SDS) zusammen. Diese vorgewärmte Hybridisierungslösung (20 µl) wurde jeweils mit 10 pmol der jeweiligen Sonde gemixt und sowohl auf den Gewebeschnitt als auch den Kontrollobjektträger gegeben. Nach der Inkubation in einer verdunkelten

Feuchtkammer bei 49°C über einen Zeitraum von 1,5 Stunden wurden die Objektträger mit aqua destillata gewaschen, im Dunklen luftgetrocknet und anschließend mit einem DAPI enthaltendem Eindeckmedium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) versehen. Die Spezifität und Sensitivität der Sonden wurde dabei in Abhängigkeit von den Ergebnissen der Vorversuche durch das Variieren der Formamid-Konzentration zwischen 0 und 40% (v/v) erreicht [1, 2].

1.3.6 Mikroskopie

Ein Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2; Carl Zeiss, Jena) wurde zur Visualisierung der Bakterien genutzt. Das Mikroskop war mit Bandpaß-Filtersätzen (F31, HQ-F41-007 und HQ-F41-001, AHF Analysetechnik, Tübingen), einer Hochdruck-Quecksilberlampe (HBO103; Osram) und 10x, 40x und 100x Objektiven ausgerüstet. Digitale Bilddatensätze zur Dokumentation wurden mit einer digitalen Kamera (AxioCam HRc Image acquisition) und einer Standard-Software (Axiovision 4.1) erstellt.

1.3.7 PCR-Amplifikation des 16S rRNA-Gens und anschließende Sequenzierung

DNA wurde aus eingebettetem Gewebsschnitten von Herzklappengewebe extrahiert. Darauf erfolgte eine pan-bakterielle Amplifikation der 16S rRNA wie zuvor beschrieben [43, 44]. Die Amplifikate wurden mit einem automatisierten DNA-Kapillar-Sequenzierer analysiert (CEQ 8000; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) und mit allen derzeit verfügbarer Sequenzen aus den öffentlichen Datenbanken verglichen (EMBL und GenBank). Hierbei wurden die Anwendungen BLAST und FASTA des Sequenz-Analyse-Programms Husar 4,1 genutzt (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland).

1.4 Ergebnisse

In der Sepsis-Studie konnten in einem großen klinischen Kollektiv Gram-positive Kokken mit einer Sensitivität von 98.65% und einer Spezifität von 99.0% molekular detektiert und identifiziert werden [1]. Der Vergleich mit der 16S rRNA Gen-Amplifizierung und Sequenzierung diente hierbei als Goldstandard. Von den 428 Blutkulturen, die Gram-positive Kokken enthielten, konnten in 334 Fällen mittels FISH Staphylokokken diagnostiziert werden. Von diesen konnten wiederum in einem weiteren Schritt 73 als *S. aureus* identifiziert werden. Von den *Staphylococcus*-negativen Fällen enthielten 25 Proben Streptokokken und 49 Proben Enterokokken. Die weitere Analyse zeigte hier 37 Infektionen mit *E. faecalis* und 10 Fälle von *E. faecium/durans*. In 16 Fällen ergaben sich im Vergleich zur Routinediagnostik diskrepante Ergebnisse. Hier bestätigte die 16S rRNA Gen-Amplifizierung und Sequenzierung in 10 Fällen das Ergebnis der FISH. 5 Fälle waren in der FISH falsch-negativ, bei einer Infektion mit *E. faecium* war das FISH-Ergebnis mit *E. faecalis* falsch positiv.

In der Endokarditis-Studie wurden Gewebeschnitte von Herzklappen-Resektaten mittels FISH untersucht [3]. Durch die gute morphologische Darstellung war eine histologische Einordnung und Orientierung möglich. Die Hybridisierung mit der EUB338-Sonde ergab in den positiven Fällen Bakterienkolonien, die sich durch ihr helles fluoreszierendes Signal deutlich vom gering autofluoreszierenden umgebenden Gewebe unterschieden. Die simultane Hybridisierung mit den Genus- und Spezies-spezifischen Sonden erlaubte in den meisten Fällen eine schnelle Identifizierung der Erreger. Insgesamt konnte FISH in 26 von 54 Fällen eine IE diagnostizieren. Alle anderen Proben waren negativ (n=28). Von den 28 FISH-negativen Fällen waren 26 ebenfalls PCR-negativ.

FISH ermöglichte die eindeutige Diagnose einer IE in 5 kultur-negativen Fällen. Bei einem Patienten wurde hierbei eine Infektion durch *Streptococcus spp.* mittels der STREP1-Sonde erkannt. Bei einem anderen Patienten wurde *S. pneumoniae/mitis* durch die STREP2-Sonde diagnostiziert. In drei weiteren Fällen konnte zwar eine bakterielle Infektion gezeigt werden, alle verfügbaren Sonden mit Ausnahme der EUB338 waren allerdings negativ. Daher wurde eine PCR durchgeführt, um die Pathogene zu identifizieren. In einem Fall ergaben PCR und anschließende Sequenzierung *T. whipplei*. Bei einem anderen Patienten wurde *B. quintana* diagnostiziert. Dieser Fall wurde gesondert publiziert, da zum ersten mal eine direkte Darstellung und Identifizierung von *Bartonella* mittels FISH im Fall einer infektiösen Endokarditis gezeigt werden konnte [2]. Nach Entwicklung bzw. Modifizierung der dazu passenden Spezies-spezifischen Oligonukleotidsonden RE-WHIP3 bzw. BAQU konnten diese Diagnosen mittels FISH eindeutig bestätigt werden. Beide Sonden stehen nun für weitere FISH Untersuchungen zur Verfügung. Der dritte nur EUB338-positive Fall blieb ungeklärt, da auch eine PCR/Sequenzierung reproduzierbar keinen Erreger identifizierte.

In 2 von 10 kultur-positiven Fällen konnten die Kulturergebnisse nicht mittels FISH bestätigt werden. In einem Fall mit drei für *E. faecalis* positiven Blutkulturen und einer positiven Gewebekultur blieb die Untersuchung durch FISH negativ. In einem ähnlichen Fall mit einer positiven Blutkultur und einer positiven Gewebekultur mit *E. faecalis* konnten keine Erreger durch FISH nachgewiesen werden.

Auf der anderen Seite konnte die FISH eine eindeutige Diagnose in 10 Fällen liefern, bei denen die Blutkulturen fraglich waren. In diesen Fällen ergaben die Blutkulturen entweder unterschiedlich Erreger einschließlich häufiger Kontaminanten oder konnten nicht reproduziert werden. Alle FISH-positiven Fälle konnten zuverlässig reproduziert werden.

Im Einzelnen konnte durch die STREP1-Sonde in 9 Fällen eine IE durch *Streptococcus spp.* beweisen. In 5 Fällen ergab die STREP2-Sonde eine Infektion mit der *S. pneumoniae / S. mitis* Gruppe. Die Genus-spezifische STAPHY-Sonde zeigt 5 Fälle mit *Staphylococcus spp.* Die für *S. aureus* spezifische SAU-sonde war in allen Fällen negativ. Bei drei weiteren Fällen wurde durch die EFAEC-Sonde eine IE durch *E. faecalis* gezeigt. ENCO, FMDUR, and

GRANU waren in allen Fällen negativ. Diese Spezies werden allgemein als typische Erreger bei IE akzeptiert. In drei Fällen konnten seltenere Bakterien, im einzelnen *B. quintana*, *T. whipplei* und *L. paracasei* nachgewiesen werden. In dem Kultur-positiven Fall mit *L. paracasei* wurde die Diagnose durch PCR und Sequenzierung bestätigt. Die FISH zeigte mittels der EUB338-Sonde typische Stäbchen in Kolonien. Angesichts des sehr seltenen Auftretens einer IE durch *L. paracasei* wurde auf die Entwicklung einer spezifischen Sonde vorerst verzichtet. Ein weiterer Fall mit EUB338-positiven Kokken blieb ungeklärt, da keine weitere FISH-Sonde positiv war und eine PCR reproduzierbar keine sequenzierbare Information ergab.

Im Vergleich zu gewebe-basierten Kulturen ergab sich in 15 von 17 kulturpositiven Fällen eine Übereinstimmung. In zwei Fällen konnten die Kulturergebnisse nicht reproduziert werden, obwohl auch die Blutkulturen übereinstimmend positiv für *E. faecalis* waren. Allerdings konnte in 11 von 37 Gewebekultur-negativen Fällen eine IE durch FISH diagnostiziert werden. In 26 gab es ein übereinstimmend negatives Ergebnis.

1.5 Diskussion

Im Zuge der Sepsisstudie wurde von uns ein Sonden-Set entwickelt, das eine schnelle und zuverlässige Identifizierung von Gram-positiven Kokken in positiven Blutkulturen ermöglicht. Insbesondere die Differenzierung von *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *Granulicatella* und *E. faecium/durans* erlaubt eine spezifische Antibiotikatherapie und verbessert somit das Patienten-Management.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte in der Endokarditis-Pilotstudie gezeigt werden, dass FISH ein hilfreiches Instrument zur Diagnostik der infektiösen Endokarditis darstellt [3]. Zum ersten Mal wurde ein größeres an IE erkranktes Patientenkollektiv (n=54) durch die FISH ausgewertet. Die 26 FISH-positiven Fälle ergaben ein für Endokarditis typisches Spektrum an Mikroorganismen. Insbesondere in kultur-negativen oder fraglichen Fällen ist diese Technik hilfreich, um definitiv eine bakterielle endokardiale Entzündung und somit eine infektiöse Endokarditis zu beweisen. Im Gegensatz zur PCR und anschließender Sequenzierung können auch Kontaminationen ausgeschlossen werden, da immer eine Bewertung der Bakterien in ihrem histologischen Kontext erfolgt. Darüber hinaus kann auch in Fällen, in denen eine längere Antibiotikatherapie vorausgegangen ist und in denen die Kulturdiagnostik versagt hat bzw. die PCR gehemmt wurde, eine Diagnose erfolgen [45, 46]. Insbesondere zeigt die FISH-Diagnose in 5 kulturnegativen und 10 fraglichen Fällen eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den Routinemethoden. Auch auf dem Gebiet der Beurteilung der Vitalität der Bakterien ergeben sich weitere Forschungsansätze. Insbesondere der komplexe Aufbau und die Entwicklung von Biofilmen lassen sich hier gut untersuchen [47-49].

Auch ohne die Nutzung der FISH ist die Visualisierung von Mikroorganismen im Herzklappengewebe ein klassisches histopathologisches Kriterium für die Diagnose der infektiösen Endokarditis. Der histopathologische Befund wird in den Duke-Kriterien als Goldstandard zur Diagnose der infektiösen Endokarditis angesehen [12, 50]. Allerdings ist die Diagnose der infektiösen Endokarditis durch Lichtmikroskopie zeitaufwendig. Die Detektion der Mikroorganismen verlangt Erfahrung und erlaubt trotzdem keine Erregeridentifizierung. FISH erlaubt zusätzlich zur Visualisierung auch die Identifizierung von Endokarditis-auslösenden Mikroorganismen direkt im Patientengewebe. Die Diagnose kann innerhalb von 24-36 Stunden erfolgen. Im Falle der Sepsis reichen 3 Stunden nach Wachstumssignal im Blutkulturautomat [1].

Kulturen sind in 5-30% aller Fälle von IE negativ [5, 15, 21]. Ein häufiger Grund ist eine vorangegangene antibiotische Therapie. Daher sollten Blutproben für die Blutkulturdiagnostik vor dem Beginn der Therapie genommen werden, was im klinischen Alltag allerdings oft nicht möglich ist. Außerdem werden seltenere Erreger wie die HACEK-Gruppe, *Abiotrophia*, Brucellen, Bartonellen oder Legionellen nur selten durch Routinemethoden entdeckt [19]. Bei vielen Krankheitserregern ist die Differenzierung bis auf die Speziesebene von entscheidender Bedeutung, so sind die Mehrzahl der *Enterococcus faecium* Isolate resistent gegen Ampicillin, wohingegen Ampicillin in der Regel noch eine effiziente Behandlung von *Enterococcus faecalis* ermöglicht. Ähnliches gilt für die Gattung *Staphylococcus*. Hier erfordern Koagulase-negative Staphylokokken eine gänzliche andere Behandlung als *Staphylococcus aureus* [51, 52].

Herzklappen-Kulturen aus chirurgisch reseziertem Material können erfolgreich zur Identifizierung von Pathogenen genutzt werden und gelten als ein Hauptkriterium für die Diagnose einer infektiösen Endokarditis. Allerdings weist diese Methode nur eine geringe Sensitivität auf [53]. Vergleichbar mit Blutkulturen führt eine vorangegangene antibiotische Therapie häufig zu falsch-negativen Fällen, falsch-positiven Fälle durch Kontaminationen können nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer schneller und zuverlässiger Methoden zur Identifizierung bis zur Spezies-Ebene erforderlich.

Aktuelle Studien haben sowohl moderne molekulare Methoden als auch histopathologische und kultur-basierte Methoden evaluiert [19, 21, 26, 27, 46, 54]. Insbesondere die PCR wurde genutzt, um diese Probleme zu überwinden. Es konnte gezeigt werden, dass durch PCR-Amplifikation des 16S rRNA-Gens und anschließende Sequenzierung der Pathogene auch in kultur-negativen Fällen identifiziert werden können [21, 25-27]. Aus diesem Grund wurde in mehreren Studien vorgeschlagen, die PCR zu einem Hauptkriterium bei der Diagnosestellung zu machen. Dieser Vorschlag wurde allerdings kontrovers diskutiert, da falsch-positive Fälle durch Kontaminationen oder falsch-negativen Fälle durch Hemmstoffe im Blut oder Gewebe möglich sind. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass bakterielle

RNA noch lange nach der Ausheilung einer infektiösen Endokarditis persistieren kann [46]. Darüber hinaus liefert die PCR keine Information bezüglich Morphologie, Anzahl, Vitalität und die räumliche Verteilung von Bakterien. Aus diesen Gründen sollte die Diagnose mittels PCR kritisch interpretiert werden.

In neusten Studien wird auch die MALDI-TOF Massenspektrometrie alternativ zur Routinediagnostik bewertet. MALDI-TOF ist eine kosteneffektive, genaue und verlässliche Methode zur Diagnostik von Mikroorganismen insbesondere aus Blutkulturen [33, 55], die auch atypische Erreger einschließlich Mykobakterien erfasst [56, 57]. Die zuverlässige Diagnose typischer Endokardiserreger wie Streptokokken wird allerdings kontrovers diskutiert [55, 58]. Die Möglichkeiten dieser Methode zur Diagnostik von Endokarditis verursachenden Erregern direkt aus Herzklappengewebe sind bislang noch nicht durch eine Studie evaluiert worden.

Diese Pilotstudie stellt FISH als ergänzende Methode zur Diagnose der Infektiösen Endokarditis vor [3]. Sie vereint die Vorteile von histopathologischen und molekularen Methoden. FISH kombiniert molekulare Detektion und Identifikation und wird daher häufig zur Identifizierung von Bakterien in ihrer natürlichen Umgebung genutzt. Wie in dieser Studie grundsätzlich gezeigt, können auch kultur-negative Fälle geklärt werden. Im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie sind Mikroorganismen aufgrund des auffälligen Signals der fluoreszierenden Sonden einfacher zu erkennen. Darüber hinaus kann FISH zwischen Kontaminationen und tatsächlichen Gewebsinfektionen unterscheiden. Diese Eigenschaft wird durch die Beurteilung der Mikroorganismen in ihrem histologischen Kontext ermöglicht. Endokarditis ist häufig durch in Mikrokolonien und Biofilmen organisierte Bakterien charakterisiert, die von extrazellulärer Matrix und Entzündungszellen umgeben werden [8, 9, 47]. Diese Strukturen können nicht durch Kontaminationen vorgetäuscht werden. FISH ist besonders erfolgversprechend zur Identifizierung von langsam wachsenden seltenen oder noch zu kultivierenden Bakterien in kultur-negativen Fällen. FISH ist schnell und leicht in der Durchführung und kann einfach in den Arbeitsablauf eines klinisch mikrobiologischen Labors integriert werden [1, 28]. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie wird FISH bereits im Institut für Mikrobiologie der Charite zur Diagnose der Infektiösen Endokarditis in ausgewählten Fällen genutzt. Die dadurch mögliche frühzeitige Einleitung einer adäquaten Antibiotikatherapie ist von großer Bedeutung, da neben der Kontrolle der lokalen endokardialen Infektion auch das Risiko für weitere Komplikationen wie septischen Embolien reduziert und somit das Patienten-Management entscheidend verbessert wird.

1.6 Limitationen

Obwohl in der Endokarditis-Studie in 26 Fällen mittels FISH die ursächlichen Bakterien identifiziert werden konnten, sollte die Methode in einer prospektiven Studie evaluiert

werden. Weiterhin ist eine Analyse der Antibiotikaresistenzen bisher nur durch kulturelle Anzucht möglich. In dieser Pilotstudie wurden insbesondere im Bezug auf Streptokokken hauptsächlich Genus- bzw. Gruppen-spezifische Sonden benutzt. Hier sollten in einer Folgestudie Spezies-spezifischen Sonden entwickelt werden. Ein generelles Problem besteht in der Notwendigkeit Gewebeproben in Form von Biopsien oder Resektionsgut zu gewinnen, eine in-vivo-Diagnostik ist nicht möglich. Zusätzlich sind aufgrund der generell niedrigen Sensitivität von mikroskopischen Untersuchungen unter anderem durch die Aufteilung der Bioplate falsch-negative Ergebnisse möglich. Im Bezug auf die Endokarditis-Studie konnte die Diagnose aufgrund der großen Erregerzahlen in den meisten Fällen aber relativ einfach gestellt werden. Im Gegensatz zur PCR und kulturbasierten Methoden besteht aber nicht die Gefahr von falsch-positiven Befunden aufgrund von Kontaminationen, da die Ergebnisse im histologischen Kontext bewertet werden.

1.7 Schlußfolgerung:

Durch diese Arbeit konnte eine rasche Differenzierung von Gram-positiven Kokken in Blutkulturen mittels FISH gezeigt werden. Bei mikroskopisch positiven Materialien erfolgte mit Hilfe der FISH innerhalb von 3 Stunden eine Erregeridentifikation. Hierfür steht jetzt ein der Verdachtsdiagnose entsprechendes FISH-Sonden-Panel zur Verfügung.

Darüber hinaus ist jetzt auch ein Erregernachweis bei Infektiöser Endokarditis mittels FISH möglich. Auch die Diagnose schwer oder bisher nicht kultivierbarer Spezies wie zum Beispiel *B. quintana* gelang sicher und reproduzierbar. Zusätzlich ist eine Differenzierbarkeit zwischen Kontamination, Besiedlung oder invasiver Infektion durch den in situ Nachweis von Mikroorganismen direkt im Gewebe gegeben. Dadurch ist in ausgewählten Fällen die frühzeitige Einleitung einer adäquaten Antibiotikatherapie und somit eine Verbesserung des Patienten-Managements möglich. Trotzdem ist die FISH hauptsächlich als Ergänzung insbesondere in kulturnegativen Einzelfällen zu sehen, sie kann und soll die Routinediagnostik nicht ersetzen.

1.8 Ausblick:

Aufbauend auf dieser Arbeit ergeben sich aber auch weitere Studienansätze insbesondere auf dem Gebiet der Biofilm-Analyse. Das Potential der FISH die Zusammensetzung, Organisation und Architektur von Bakterienkolonien direkt im Gewebe zu visualisieren, macht diese Technik zu einem wertvollen Instrument für die medizinische Biofilm-Forschung. Alternativ ergeben sich fächerübergreifend weitere Ansätze auf dem Gebiet der molekularen Bildgebung. Hierbei können biologische Prozesse auf zellularer und molekularer Ebene in vivo dargestellt werden [59, 60]. Durch die simultane Akquirierung dieser Daten zusammen mit konventionellen anatomischen Darstellungsmethoden wie Magnetresonanztomographie

(MRT) und Computertomographie (CT) sollte eine frühere Detektion und genauere Verlaufsbeurteilung entzündlicher und maligner Erkrankungen in absehbarer Zukunft möglich sein. Relativ etabliert ist hier bereits die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die mit Hilfe von Radionukleotiden maligne Erkrankungen mit hoher Sensitivität und akzeptabler Spezifität detektiert [61]. Darüber hinaus konnte bereits durch eine Kombination von MRT-Bildgebung bei T2-gewichteten Bildern und superparamagnetischen Eisenoxid Nanopartikeln (SPIO), die an C3-Komplementfaktoren gekoppelt waren, Nephritiden im Mausmodell dargestellt werden [62]. Als Weiterentwicklung dieses Forschungsansatzes wäre die Kombinierung der SPIO- Partikel mit spezifischen Sonden denkbar, um am Beispiel der Endokarditis bakterielle Entzündung in vivo ohne invasive Hilfsmittel oder Strahlenbelastung darstellen zu können. Eine Herausforderung wäre hierbei neben der sicherlich problematischen Entwicklung dieser Sonden auch die Weiterentwicklung der MRT-Geräte, um die benötigte hohe räumliche Auflösung zu gewährleisten.

1.9 Literaturverzeichnis

1. Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D, et al. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32:S51-59.
2. Gescher DM, Mallmann C, Kovacevic D, et al. A view on Bartonella quintana endocarditis -confirming the molecular diagnosis by specific fluorescence in situ hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60:99-103.
3. Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D, et al. Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study. *Clin Microbiol Infect* 2009;20:20
4. Hill EE, Herijgers P, Herregods MC and Peetermans WE. Evolving trends in infective endocarditis. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:5-12.
5. Mylonakis E, Calderwood SB. Infective endocarditis in adults. *N Engl J Med*. 2001;345:1318-1330.
6. Tugtekin SM, Alexiou K, Wilbring M, et al. Native infective endocarditis: which determinants of outcome remain after surgical treatment? *Clin Res Cardiol*. 2006;95:72-79.
7. Bayer AS, Bolger AF, Taubert KA, et al. Diagnosis and management of infective endocarditis and its complications. *Circulation*. 1998;98:2936-2948.
8. Durack DT. Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions. *J Pathol*. 1975;115:81-89.
9. Durack DT, Beeson PB. Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation. *Br J Exp Pathol*. 1972;53:44-49.
10. Prendergast BD. The changing face of infective endocarditis. *Heart*. 2006;92:879-885. Epub 2005 Oct 2010.
11. Sliwa K, Carrington M, Mayosi BM, Zigiriadis E, Mvungi R and Stewart S. Incidence and characteristics of newly diagnosed rheumatic heart disease in Urban African adults: insights from the Heart of Soweto Study. *Eur Heart J* 2009;7:7
12. Greub G, Lepidi H, Rovey C, et al. Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. *Am J Med*. 2005;118:230-238.
13. Miro JM, del Rio A and Mestres CA. Infective endocarditis and cardiac surgery in intravenous drug abusers and HIV-1 infected patients. *Cardiol Clin*. 2003;21:167-184, v-vi.
14. Raoult D, Abbara S, Jassal DS and Kradin RL. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 5-2007. A 53-year-old man with a prosthetic aortic valve and recent onset of fatigue, dyspnea, weight loss, and sweats. *N Engl J Med*. 2007;356:715-725.
15. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:177-207.
16. Durack DT, Lukes AS and Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. *Am J Med*. 1994;96:200-209.
17. Li JS, Sexton DJ, Mick N, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000;30:633-638. Epub 2000 Apr 2003.
18. Lefmann M, Schweickert B, Buchholz P, et al. Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3760-3767.
19. Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47:1-13.
20. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet*. 2004;363:139-149.
21. Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol*. 2003;41:763-766.

22. Mann P, Nye F, Williams G, Walker A and Amadi A. From trench fever to endocarditis. *Postgrad Med J.* 2003;79:655-656.
23. Muhlemann K, Matter L, Meyer B and Schopfer K. Isolation of *Coxiella burnetii* from heart valves of patients treated for Q fever endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1995;33:428-431.
24. Raoult D, Birg ML, La Scola B, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med.* 2000;342:620-625.
25. Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R, Rued C, Bottger EC and Altwegg M. Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. *Clin Infect Dis.* 2003;37:167-172. Epub 2003 Jul 2009.
26. Millar B, Moore J, Mallon P, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis--a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis.* 2001;33:673-680.
27. Millar BC, Moore JE. Current trends in the molecular diagnosis of infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:353-365.
28. Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods.* 2000;41:85-112.
29. Kempf VA, Trebesius K and Autenrieth IB. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2000;38:830-838.
30. Moter A, Leist G, Rudolph R, et al. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology.* 1998;144:2459-2467.
31. Schlafer S, Nordhoff M, Wyss C, et al. Involvement of *Guggenheimella bovis* in digital dermatitis lesions of dairy cows. *Vet Microbiol.* 2008;128:118-125. Epub 2007 Oct 2007.
32. Schmiedel D, Epple HJ, Loddenkemper C, et al. Rapid and accurate diagnosis of human intestinal spirochetosis by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1393-1401.
33. Schweickert B, Moter A, Lefmann M and Gobel UB. Let them fly or light them up: matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Apmis.* 2004;112:856-885.
34. Wagner M, Horn M and Daims H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6:302-309.
35. Moter A, Kovacevic D, Mallmann C and Gobel UB. [Sensitive FISH--fluorescence in situ hybridization in microbiological diagnosis]. *Pneumologie.* 2005;59:425-427.
36. Loy A, Horn M and Wagner M. probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:514-516.
37. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R and Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:1919-1925.
38. Wallner G, Amann R and Beisker W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry.* 1993;14:136-143.
39. Trebesius K, Leitritz L, Adler K, Schubert S, Autenrieth IB and 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.* 2000;188:169-175.
40. Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridisation with 16S rDNA probes. *J Microbiol Methods.* 2002;50:115-121.
41. Jansen GJ, Mooibroek M, Idema J, Harmsen HJ, Welling GW and Degener JE. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 2000;38:814-817.
42. von Herbay A, Ditton HJ and Maiwald M. Diagnostic application of a polymerase chain reaction assay for the Whipple's disease bacterium to intestinal biopsies. *Gastroenterology.* 1996;110:1735-1743.
43. Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ and Noller HF. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:4801-4805.

44. Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B and Gobel UB. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1399-1403.
45. Adam T, Gobel U and Bredt W. Effects of growth phase and antibiotics on quantitative DNA/RNA hybridization. *Mol Cell Probes.* 1990;4:375-383.
46. Röver C, Greub G, Lepidi H, et al. PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:163-167.
47. Marrie TJ, Cooper JH and Costerton JW. Ultrastructure of cardiac bacterial vegetations on native valves with emphasis on alterations in bacterial morphology following antibiotic treatment. *Can J Cardiol.* 1987;3:275-280.
48. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR and Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-745.
49. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009;11:1034-1043.
50. Lepidi H, Durack DT and Raoult D. Diagnostic methods current best practices and guidelines for histologic evaluation in infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am.* 2002;16:339-361, ix.
51. Arias CA, Murray BE. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6:637-655.
52. Wang JL, Chen SY, Wang JT, et al. Comparison of both clinical features and mortality risk associated with bacteremia due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S. aureus*. *Clin Infect Dis.* 2008;46:799-806.
53. Campbell WN, Tsai W and Mispireta LA. Evaluation of the practice of routine culturing of native valves during valve replacement surgery. *Ann Thorac Surg.* 2000;69:548-550.
54. Casalta JP, Gouriet F, Roux V, Thuny F, Habib G and Raoult D. Evaluation of the LightCycler SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28:569-573. Epub 2008 Dec 2002.
55. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009;49:543-551.
56. Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W and Eschrich K. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2392-2397.
57. Lefmann M, Honisch C, Bocker S, et al. Novel mass spectrometry-based tool for genotypic identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2004;42:339-346.
58. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2009;4:e8041.
59. Margolis DJ, Hoffman JM, Herfkens RJ, Jeffrey RB, Quon A and Gambhir SS. Molecular imaging techniques in body imaging. *Radiology.* 2007;245:333-356.
60. Raatschen HJ, Fu Y, Rogut V, et al. [Effects of MRI-assayed microvascular permeability on the accumulation of vinorelbine in xenograft tumors]. *Rofo* 2009;182:133-139
61. Czernin J, Benz MR and Allen-Auerbach MS. PET/CT imaging: The incremental value of assessing the glucose metabolic phenotype and the structure of cancers in a single examination. *Eur*;73:470-480.
62. Serkova NJ, Renner B, Larsen BA, et al. Renal Inflammation: Targeted Iron Oxide Nanoparticles for Molecular MR Imaging in Mice. *Radiology*;2010:23

2. Anteilserklärung

Herr **Christian Mallmann** hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen und den damit verbundenen Forschungsarbeiten:

Publikation 1:

Mallmann C; Siemoneit S; Schmiedel D; Petrich A; Gescher DM; Halle E; Musci M; Hetzer R; Göbel UB; Moter A. Fluorescence in Situ Hybridisation to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study. Clin Microbiol Infect. 2010 Jun;16(6):767-73. Epub 2009 Aug 20.

60 Prozent

Impact factor: 3,283 (5-year IF JCR Science Edition 2008)

Beitrag im Einzelnen :

1. Zusammen mit A. Moter Planung und Design der Studie.
2. Optimierung und Evaluation der RE-WHIP3-Oligonukleotidsonde.
3. Materialsammlung und Aufbereitung inklusive Anzucht der Kontrollstämme.
4. Vorbereitung und Durchführung der Versuche.
5. Erstellung der Datenbank und statistische Auswertung der erhobenen Messwerte.
6. Erstellung und Aufbereitung des Bildmaterials und der Graphiken.
7. Verfassen des Artikels.

Publikation 2:

Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D, Siemoneit S, Mallmann C, Halle E, Göbel UB, Moter A. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. Int J Antimicrob Agents. 2008 Nov;32 Suppl 1:S51-9. Epub 2008 Aug 20.

20 Prozent

Impact factor: 2,713 (5-year IF JCR Science Edition 2008)

Beitrag im Einzelnen:

1. Vorbereitung und teilweise Durchführung der Versuche.
2. Design, Optimierung und Evaluation der Strep2- und GRANU-Oligonukleotidsonde.
3. Erstellung und Aufbereitung des Bildmaterials und der Graphiken.
4. Durchführung von Korrekturarbeiten am Manuskript.

Publikation 3:

Gescher DM, Mallmann C, Kovacevic D, Schmiedel D, Borges AC, Schweickert B, Göbel UB, Moter A. A view on Bartonella quintana endocarditis - confirming the molecular diagnosis by specific fluorescence in situ hybridization.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Jan;60(1):99-103. Epub 2007 Sep 21.

20 Prozent

Impact factor: 2,417 (5-year IF JCR Science Edition 2008)

Beitrag im Einzelnen:

1. Zusammen mit A. Moter Koordination der Studie.
2. Vorbereitung und teilweise Durchführung der Versuche.
3. Design, Optimierung und Evaluation der BAQU- Oligonukleotidsonde.
4. Erstellung der Datenbank.
5. Erstellung und Aufbereitung des Bildmaterials.
6. Durchführung von Korrekturarbeiten am Manuskript.

3. Druckexemplare

3.1 Mallmann C. et al. Clinical Microbiology and Infection. 2010 Jun;16(6):767-73. Epub 2009 Aug 20.

3.2. Gescher DM et al. Int J Antimicrob Agents. 2008 Nov;32 Suppl 1:S51-9. Epub 2008 Aug 20

3.3 Gescher DM et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Jan;60(1):99-103. Epub 2007 Sep 21.

4. Lebenslauf

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

5. Publikationsliste

1. 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.* Epub 2009 Aug 20.
2. Mallmann CV, Wolf KJ, Wacker FK. Retrieval of vascular foreign bodies using a self-made wire snare. *Acta Radiol.* 2008 Dec;49(10):1124-8.
3. Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D, Siemoneit S, Mallmann C, Halle E, Göbel UB, Moter A. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Nov;32 Suppl 1:S51-9. Epub 2008 Aug 20.
4. Gescher DM, Mallmann C, Kovacevic D, Schmiedel D, Borges AC, Schweickert B, Göbel UB, Moter A. A view on Bartonella quintana endocarditis - confirming the molecular diagnosis by specific fluorescence in situ hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Jan;60(1):99-103. Epub 2007 Sep 21.
5. Moter A, Kovacevic D, Mallmann C, Göbel UB. Sensitive FISH-fluorescence in situ hybridization in microbiological diagnosis. *Pneumologie.* 2005 Jun;59(6):425-7.

6. Erklärung

„Ich, Christian Mallmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Diagnose der Infektiösen Endokarditis mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

7. Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation geht vor allem an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Göbel und an meine Betreuerin Frau Dr. Moter, denn Sie brachten mir sehr viel Geduld entgegen und sorgten mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit. Besonders möchte ich mich bei meiner Frau Jasmin bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt hat, sondern mich stets aufbaut und für die erforderliche Abwechslung gesorgt hat. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären. Dank auch meinen Kollegen im Institut für Mikrobiologie, die mich immer unterstützt haben und damit einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Doktorarbeit geleistet haben.