

Aus der Herzchirurgischen Poliklinik  
der Universität München  
Vorstand/Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

## **Infektiöse Pathogenese der Aortenklappenstenose**

Welche Rolle spielen Bakterien in der Entwicklung struktureller  
Herzklappenerkrankungen?

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Marion Alber  
aus Meran (IT)

Jahr  
2020



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: **Prof. Dr. med. Christian Hagl**

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Thomas Lange  
apl. Prof. Dr. Julinda Mehilli  
apl. Prof. Dr. Andreas May

Betreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: **Prof. Dr. med. Dr. rer. medic. Dr. rer. biol. hum.  
Andreas Oberbach MPH**

**Dr. med. Erik Bagaev**

Dekan: **Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel**

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2020

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Theoretischer Hintergrund .....	2
2.1	Aortenklappenstenose .....	2
2.1.1	Ätiologie und Pathogenese .....	3
2.1.1.1	Allgemeine Aspekte .....	3
2.1.1.2	Theorie der kardiovaskulären Risikofaktoren .....	3
2.1.1.3	Theorie des gestörten Calciumstoffwechsels .....	4
2.1.1.4	Theorie der infektiösen Pathogenese .....	5
2.1.1.5	Bakterielle Überlebensstrategien .....	9
2.1.2	Klassifikation der Aortenklappenstenose .....	12
2.2	Strukturelle Herzklappenerkrankung versus akut infektiöse Endokarditis .....	16
3	Problemstellung .....	19
4	Material und Methoden .....	20
4.1	Materialien .....	20
4.1.1	Farbstoffe, Antikörper, Lösungsmittel .....	20
4.1.2	Primer und Kits .....	21
4.1.3	Kulturmedien .....	22
4.1.4	Geräte und Software .....	23
4.2	Methoden .....	24
4.2.1	Studiendesign .....	24
4.2.2	Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial .....	24
4.2.3	Biomaterial Handling und Prozessierung .....	34
4.2.4	Histopathologische Untersuchung .....	34
4.2.5	Mikrobiologische Analyse .....	36
4.2.6	Molekularbiologische Diagnostik .....	38
4.2.7	Statistik .....	40
5	Ergebnisse .....	41
5.1	Phänotypisierung des Patientenkollektivs .....	41
5.1.1	Anamnestiche Parameter .....	42
5.1.2	Klinische Zeichen und Parameter der Entzündung .....	46
5.1.3	Klappenmorphologie .....	47
5.2	Operationsbezogene Daten .....	49
5.2.1	Risiko-SCORE-Analyse .....	49
5.2.2	Intraoperative Verlaufsdaten .....	50

5.2.3	Makroskopische Graduierung.....	50
5.3	Analyse des Herzklappengewebes.....	52
5.3.1	Mikrobiologie.....	52
5.3.2	Histopathologie.....	53
5.3.3	Molekularbiologie.....	57
5.4	Postoperativer Verlauf.....	61
5.4.1	Reaktion des Immunsystems.....	61
5.4.2	Postoperative Komplikationen.....	62
5.4.3	Mortalitätsrate.....	63
6	Diskussion.....	65
7	Zusammenfassung.....	93
8	Anhang.....	96
8.1	Tabellenverzeichnis.....	96
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	96
8.3	Veröffentlichungen.....	98
9	Literaturverzeichnis.....	99
	Danksagung.....	110
	Eidesstattliche Versicherung.....	111

## Abkürzungsverzeichnis

ACB	Aortokoronarer Bypass
Agg	Aggregation Substances
AI	Aortenklappeninsuffizienz
aIE	akut infektiöse Endokarditis
AK	Antikörper
AS	Aortenklappenstenose
BK	Blutkultur
BMI	Body-mass-Index
BSA	Body surface area
ClfA	Clumping-Faktor
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
E.coli	Escherichia coli
EF	Ejektionsfraktion
Efb	Fibrinogen-bindendes Protein
Esp	Enterococcal Surface Protein
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
FIB-SEM	Focussed Ion Beam-Scanning Electron Microscopy
FrBPA	Fibronectin-bindendes Protein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	High flow
HG	High gradient
HipA/B	high persister protein A/B
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HSP-60	Hitzeschockprotein-60
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6
KHK	Koronare Herzerkrankung
KÖF	Klappenöffnungsfläche
LDL	Low Density Lipoprotein
LF	Low flow
LG	Low gradient

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität-München
LukD	Leukotoxin D
LV	Linksventrikulär
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MI	Mitralklappeninsuffizienz
MMP	Matrix-Metalloprotease
MS	Mitralklappenstenose
NF-kB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NYHA	New York Heart Association
OP	Operation
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PML	Polymorphonukleäre Leukozyten
PVL	Panton-Valentin-Leukozidin
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RT-PCR	real-time-PCR
Staph.	Staphylococcus
Strept.	Streptococcus
sVHD	Structural Heart Valve Disease = chronisch strukturelle Herzklappenerkrankung
T/A	Toxin/Antitoxin
TAVI	Transkatheter-Aortenklappen-Implantation
TEE	Transösophageale Echokardiographie
TI	Trikuspidalklappeninsuffizienz
TNFa	Tumornekrosefaktor a
TTE	Transthorakale Echokardiographie

## 1 Einleitung

Die kalzifizierende Aortenklappenstenose (Abb.1, Seite 2) stellt in den westlichen Industrienationen die häufigste Herzklappenerkrankung überhaupt [1] und hinter Arteriellem Hypertonus und der Koronaren Herzerkrankung, die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung dar [2]. Durch den demographischen Wandel, mit einer immer älter werdenden Bevölkerung, konnte in den letzten Jahren eine steigende Inzidenz der Erkrankung beobachtet werden [3, 4].

Die Prävalenz der Aortenklappensklerose, die als präklinische Vorstufe der Stenose anzusehen ist, steigt im Alter rapide an und liegt in den Industrienationen bei 25% bei den über 65-jährigen und sogar 50% bei den über 85-jährigen [5, 6].

Schlussendlich entwickelt sich jedoch nur ein Teil dieser Aortenklappensklerosen mit einer Progressionsrate von 2% pro Jahr, über mehrere Jahre, zur Stenose weiter und betrifft damit ungefähr 2-7% der > 65-jährigen Europäer [7].

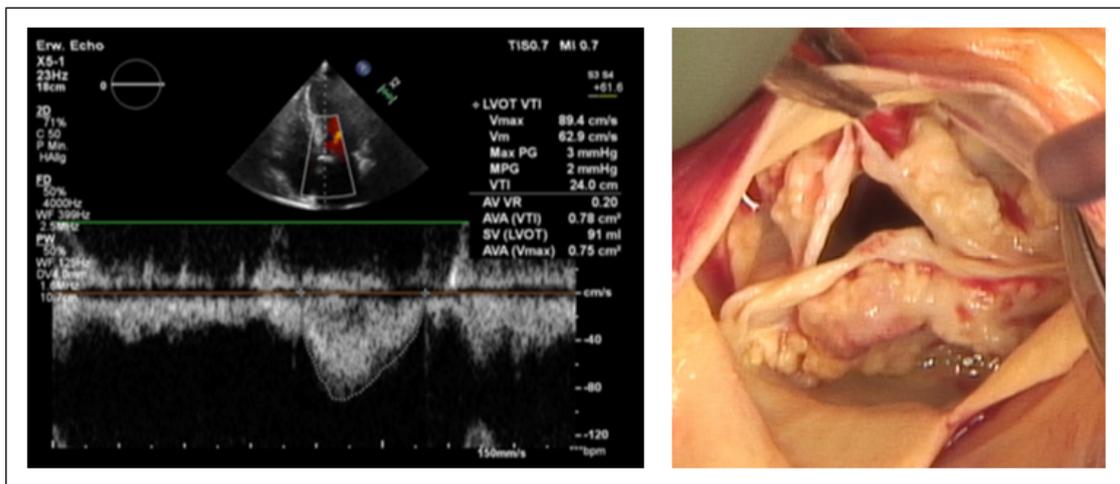
Da für diese Erkrankung bis heute keine ausreichende medikamentöse Therapie angeboten werden kann [8], stellen verkalkte Aortenklappenstenosen die häufigste Indikation für einen operativen Herzklappenersatz in den westlichen Industrienationen dar [9]. Der Goldstandard in der Behandlung der schweren symptomatischen Aortenklappenstenose liegt aktuell im Aortenklappenersatz, der sowohl konventionell chirurgisch als auch minimal invasiv über die kathetergestützte Implantation einer biologischen Klappenprothese, durch Verdrängen der nativen Klappe, durchgeführt werden kann [10].

Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine progressive Fibrosierung, Verkalkung und damit Verdickung der Aortenklappe [1]. Über Jahre hinweg kann dies eine schwere Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts bedingen [11], wodurch es zu einer chronischen Druckbelastung des linken Ventrikels kommt, der darauf mit konzentrischer Hypertrophie reagiert. In Folge dessen kommt es zu einer Zunahme des Wandstress und durch die hohe Nachlast zu einer reduzierten Ejektionsfraktion des linken Ventrikels [12]. Dies kann sich durch Symptome in Form von Druckgefühl auf der Brust, belastungsabhängiger Dyspnoe, Schwindel und Synkopen äußern. Die meisten Aortenklappenstenosen werden allerdings erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium mit schwerer Obstruktion symptomatisch [13].

Anders als früher angenommen, handelt es sich bei der Aortenklappenstenose um einen aktiven Prozess der Inflammation [14, 15], dessen Pathogenese noch nicht vollständig verstanden ist.

Da es allerdings Hinweise für einen Zusammenhang von subakuter Infektion und der Entwicklung einer chronisch strukturellen Herzklappenerkrankung (**sVHD**) gibt [16, 17] und auch einige Studien nahe legen, dass insbesondere das TAVI-Prozedere mit einer höheren Endokarditisrate assoziiert ist [18, 19], gilt es diesen Ansatz der Pathogenese näher zu betrachten. So interessiert v.a. die relative Häufigkeit der bakteriellen Keimbelastung in chronisch strukturellen Aortenklappenstenosen.

Wenn nämlich eine Infektion primär die Pathogenese von kalzifiziertem Herzklappengewebe bedingt und eine mikrobiologische Anzucht von den in den Verkalkungen persistenten Keimen gelingt, stellt dieses Patientenkontingent im Besonderen eine Risikogruppe für die Ausprägung einer akut infektiösen Endokarditis (**aIE**) nach interventioneller Klappenimplantation dar.



**Abbildung 1:** A: Präoperativer, echokardiographischer Befund eines 70-jährigen sVHD-Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose. Die Untersuchung wurde in der Herzchirurgischen Poliklinik im Klinikum Großhadern erhoben und dokumentiert.

B: Intraoperative makroskopische Darstellung einer In-situ massiv verkalkten, schweren Aortenklappenstenose eines 70-jährigen Patienten mit Indikation zum operativen Herzklappenersatz im Klinikum Großhadern.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Aortenklappenstenose

Strukturelle Herzklappenerkrankungen spielen gesellschaftlich und wirtschaftlich eine bedeutende Rolle [5], was es umso wichtiger macht, die noch nicht vollständig verstandene Pathogenese der Aortenklappenstenose genauer zu verstehen.

## **2.1.1 Ätiologie und Pathogenese**

### **2.1.1.1 Allgemeine Aspekte**

In der Ätiologie der Aortenklappenstenose ist zu allererst zwischen rheumatisch bedingter Stenose, angeborener Veränderung oder degenerativer, im Alter vorherrschender Kalzifikation der Aortenklappe zu unterscheiden [1].

Während die durch rheumatisches Fieber bedingte Klappenerkrankung in den westlichen Industrienationen nur mehr sehr selten vorkommt [20], spielt die degenerative Aortenklappenverkalkung eine immer bedeutendere Rolle [21] und stellt mittlerweile die häufigste Herzklappenerkrankung in Europa und Nordamerika dar [22].

Obwohl es zahlreiche Studien zur Pathogenese der degenerativen Aortenklappenverkalkung gibt, konnte der pathogenetische Mechanismus bis heute nicht vollständig geklärt werden [23].

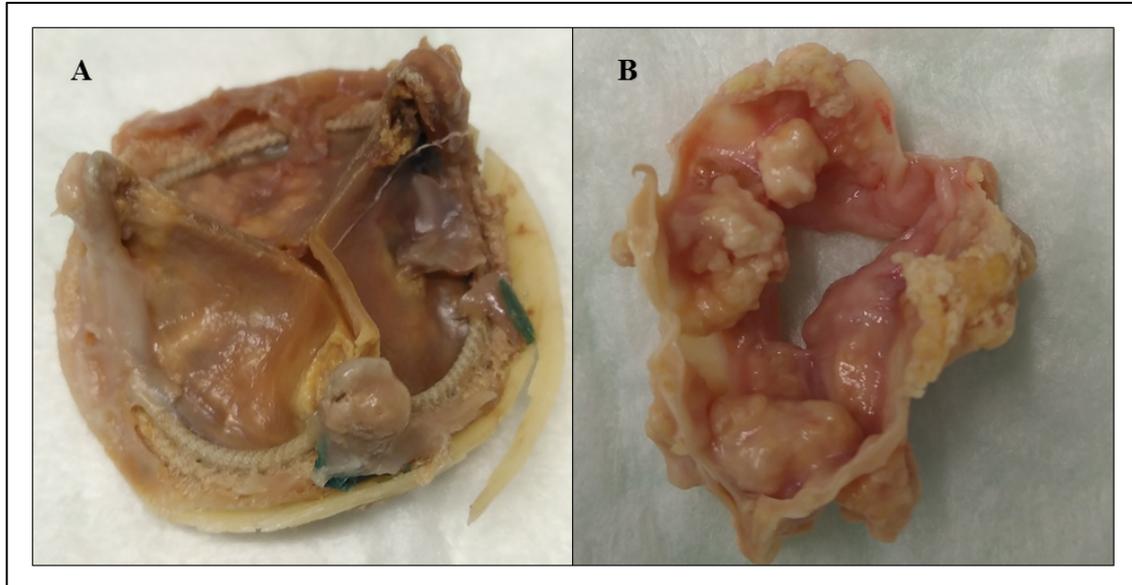
Die meisten Studien unterstützen allerdings die gemeinsame Hypothese, dass es sich bei der Kalzifikation der Aortenklappe um einen aktiven, zellulären Prozess mit chronischer Inflammation und nicht wie früher angenommen, um einen passiven, degenerativen Prozess handelt [24-26]. Wobei die Degeneration im Rahmen einer mechanischen Überbelastung und Veränderung des Flussprofils über der Aortenklappe nicht komplett vernachlässigt werden kann, da beispielsweise kongenitale Vitien, wie die bikuspidale Aortenklappe, sehr häufig zu Kalzifikationen und Stenosierung neigen [27].

### **2.1.1.2 Theorie der kardiovaskulären Risikofaktoren**

Seit Jahren besteht die Annahme, dass die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren - Diabetes, Hyperlipidämie, Arterieller Hypertonus, Rauchen und familiäre Vorbelastung – auch bei der Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenstenose (Abb. 2 Seite 4) eine Rolle spielen [23, 28, 29].

Am häufigsten ist dabei wohl der Zusammenhang zwischen Akkumulation von oxidierten LDL-Partikeln in der Aortenklappe und der Klappenverkalkung beschrieben [15, 28, 30, 31]. Dass Hyperlipidämie eine Rolle bei der Pathogenese der Aortenklappenstenose spielt, zeigt eine Studie über die Prävalenz der Aortenklappenverkalkung in Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie. Bei allen Patienten mit homozygoter FH konnte in der Untersuchung eine Aortenklappenverkalkung festgestellt werden und auch Patienten mit heterozygoter FH wiesen ein deutlich erhöhtes Risiko für eine Herzklappenverkalkung auf [32].

Die genaue Bedeutung der Lipidablagerung im Rahmen der Klappenverkalkung ist jedoch weiterhin unklar, denn der Einsatz von Statinen und damit die Reduktion des Cholesterinspiegels konnte in Studien das Outcome der Patienten mit Aortenklappenstenose, anders als zu erwarten, **nicht** verbessern [33].



**Abbildung 2:** (A) Explantierte, schwer verkalkte Aortenklappenprothese eines 75-jährigen Patienten - operiert in der Herzchirurgischen Poliklinik Großhadern, Juni 2016; B: Explantierte, native Aortenklappe mit großen Kalkplaques einer 65-jährigen Patientin mit Indikation zum operativen Herzklappenersatz Januar 2017 im Klinikum Großhadern.

### 2.1.1.3 Theorie des gestörten Calciumstoffwechsels

Ein weiterer wichtiger pathogenetischer Faktor, der zur Entstehung von kalzifizierenden Herzklappenerkrankungen beiträgt, wird in einer Störung des Calcium- und Knochenstoffwechsels gesehen [34].

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass es in der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen, wie der Atherosklerose und der kalzifizierenden Aortenklappenstenose, zu Ablagerungen in Form von amorphen Calciumphosphat sowie der Bildung von harten knochenähnlichen Verkalkungen kommt [15].

Anatomisch gesehen besteht die Aortenklappe aus 3 dünnen Schichten: der Fibrosa, Spongiosa und Ventrikularis [8]. Diese Schichten wiederum beinhalten verschiedene Arten von Zellen, von denen die Endothelzellen und interstitiellen Zellen den Hauptanteil bilden. Die Endothelzellen schützen das darunterliegende Herzklappengewebe, indem sie die Permeabilität des Gewebes und die Adhäsion von Entzündungszellen regulieren und daneben auch die Differenzierung und pathologische Proliferation der interstitiellen Zellen reduzieren [35]. Diese interstitiellen Zellen machen den Großteil der

Zellpopulation im Herzklappengewebe aus [36] und kommen in allen drei Klappenschichten vor. Dabei stellt die Fibrosa die Schicht mit der höchsten und die Spongiosa die mit der niedrigsten Zelldichte dar [35].

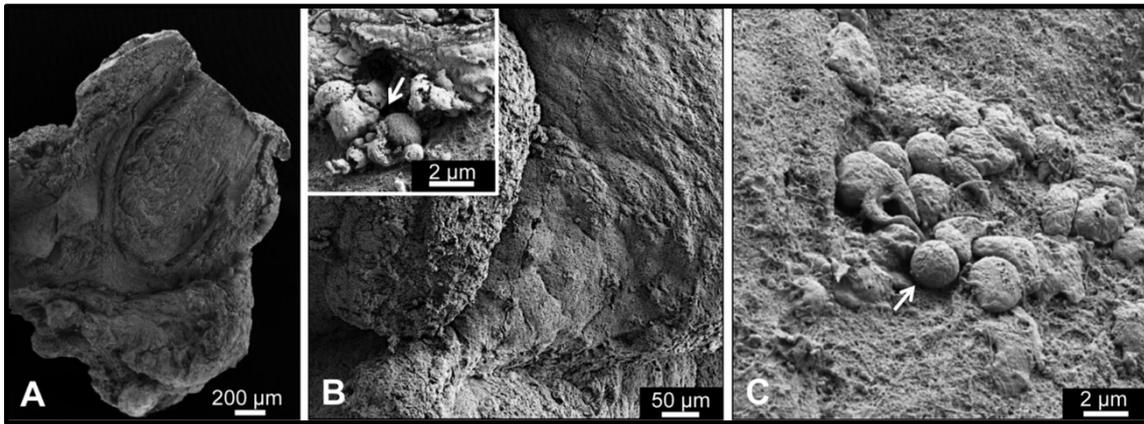
Man geht davon aus, dass diese interstitiellen Zellen, als Antwort auf eine proinflammatorische Stimulation, eine Veränderung ihres Phänotyps durchlaufen können [2]. So entwickeln sich diese interstitiellen Zellen von ursprünglichen Fibroblasten/Myofibroblasten zu Zellen mit Osteoblasten-ähnlichen Eigenschaften [25]. Durch Endothelschäden wird es zirkulierenden LDL oder Lipoprotein(a) Partikeln ermöglicht, sich in den valvulären Interstitiellen Zellen abzulagern, um anschließend im oxidierten Zustand Zytokine und Entzündungszellen anzulocken [29]. Freigesetzte Entzündungsmediatoren wie Leukotriene oder Prostaglandine aktivieren über spezifische Rezeptoren die osteoblasten-ähnlichen valvulären Interstitiellen Zellen und tragen so zur strukturellen Veränderung und Mineralisation der Aortenklappe bei [28].

#### **2.1.1.4 Theorie der infektiösen Pathogenese**

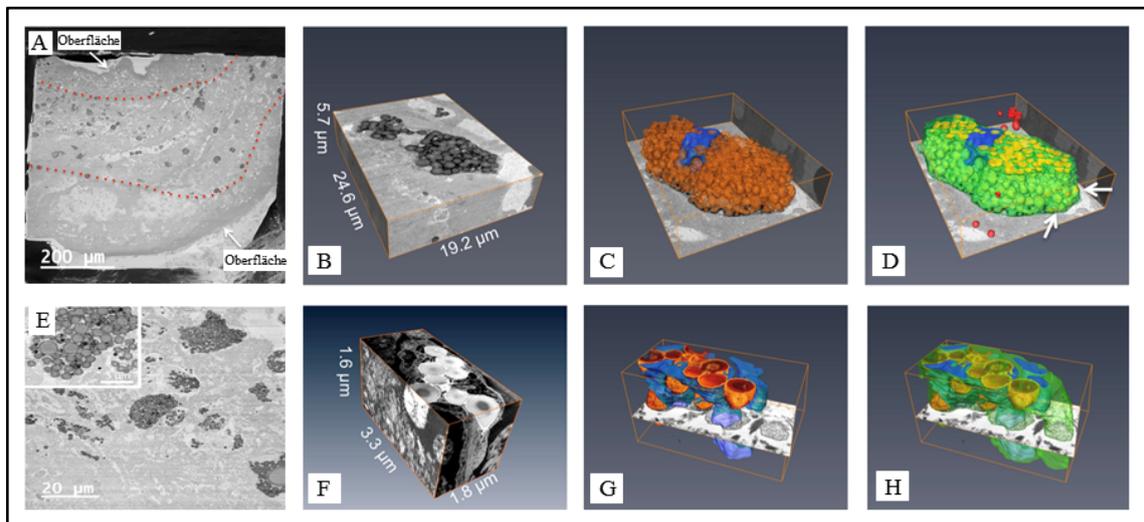
Mehrere aktuelle wissenschaftliche Arbeiten weisen auf einen Zusammenhang zwischen kalzifizierenden Veränderungen chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen und einer subklinischen bakteriellen Infektion des Herzklappengewebes hin [17, 37-39]. Im Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit soll diese Theorie einer infektiösen Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen anhand eigener wissenschaftlicher Untersuchungen weiterverfolgt und genauer untersucht werden.

##### *Klinische Hinweise im humanen Gewebe*

In den 90er-Jahren des letzten Jahrhunderts untersuchten 3 Arbeitsgruppen unabhängig voneinander mehr als 600 **nicht-endokarditische** Herzklappengewebe von Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung auf eine mögliche bakterielle Infiltration [40-42]. Obwohl in diesen Studien aus 11-17% der Herzklappen typische Endokarditis-Erreger isoliert werden konnten, interpretierten alle 3 Arbeitsgruppen die Befunde als Kontamination des Klappengewebes [40-42]. Die folgenden Jahre waren von der Etablierung sensitiver molekularbiologischer Nachweisverfahren geprägt, die auch immer wieder herangezogen wurden, um bakterielle Erreger aus Verkalkungen chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen zu isolieren [17, 38, 43]. Auch hochauflösende Verfahren wie die Elektronenmikroskopie (Abb. 3 und 4, Seite 6) wurden in den letzten Jahren zunehmend für den Nachweis von Bakterien im Herzklappengewebe etabliert [44].



**Abbildung 3:** Die Elektronen-mikroskopische Abbildung (SEM) zeigt bakterielle Kokken, die sich gruppiert auf der glatten Oberfläche einer nativen Aortenklappe ablagern. Dabei sind sowohl teilweise zerstörte Kokken (B), als auch völlig intakte Kokken (C) auf dem Klappengewebe erkennbar. Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Andreas Oberbach. [44]



**Abbildung 4:** FIB-SEM basierte, ultrastrukturelle Darstellung von bakteriell infiltriertem Herzklappengewebe. A/E zeigen zwei elektronenmikroskopische Darstellungen von nativen mit *Staphylococcus aureus* infizierten Herzklappen. B-D sowie F-H (höher auflösend) zeigen Elektronenmikroskopische 3D-Rekonstruktionen (20000 Serienschnitte) von mit Bakterien infiltrierten Monozyten im Herzklappengewebe. Die Bakterien zeigen sich sowohl intrazellulär (gelb) als auch extrazellulär (rot) im Gewebe. Zellkerne werden in der Abbildung blau und Zellmembranen grün dargestellt. Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Andreas Oberbach [44]

So kommt seit Anfang des neuen Jahrhunderts wiederholt die Vermutung auf, dass der Erreger *Chlamydia pneumoniae* nicht nur in der Entwicklung der Atherosklerose eine Rolle spielt, sondern auch an der Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen beteiligt ist [45-47].

In Untersuchungen konnte der Erreger beispielsweise mittels Immunhistochemie und PCR in kalzifizierten Klappenstrukturen nachgewiesen werden [43, 48].

*Chlamydia pneumoniae* ist ein wichtiger Erreger einer Vielzahl respiratorischer Infektionen und assoziiert mit 5-10% der ambulant erworbenen Pneumonien, Bronchitiden sowie Sinusitiden. Der obligat intrazelluläre Erreger hat die Tendenz zur Entwicklung chronischer Infektionen, beispielsweise über die Persistenz in Makrophagen [16]. Zirkulierende Komponenten des Immunsystems können sich, nach intrazellulärer Aufnahme des Erregers, am Endothel und glatten Muskelzellen anlagern und diese zur Apoptose zwingen. *Chlamydia pneumoniae* führt zur vermehrten Expression von HSP-60, wodurch die Produktion von Zytokinen, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MMPs, induziert wird. *C. pneumoniae* ist in der Lage CD4+ und CD8+ positive T-Lymphozyten zu aktivieren und über den NF-kB Signalweg eine vermehrte Expression von Zytokinen und eine dadurch ausgelöste Entzündungsreaktion zu induzieren [16, 37, 49, 50].

Die Entstehung von atherosklerotischen Plaques ist, wie zahlreiche Daten belegen, gekennzeichnet durch chronische Inflammation, welche sich durch massive Infiltration mit Lymphozyten, Makrophagen oder Schaumzellen darstellt [15, 16, 23]. Die Vermutung, dass eine Infektion diesen Entzündungsprozess triggern und somit indirekt die Pathogenese beeinflussen könnte liegt somit sehr nahe. Auch die Anwesenheit von aktivierten T-Lymphozyten in atherosklerotischen Plaques weist auf einen lokalen Immunprozess, der gegen lokal vorhandene Antigene gerichtet ist, hin [16].

In einer aktuellen Metaanalyse von Kaden et.al 2005 zum möglichen Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae* und kalzifizierenden Aortenstenosen konnte, aufgrund der Heterogenität der Studien und Patientenzahlen, jedoch kein eindeutiger Zusammenhang festgestellt werden, wobei für die Klärung weitere diagnostische und pathologische Untersuchungen erforderlich sind [51].

Oralpathogene Bakterien der Mundflora spielen, wie in zahlreichen Studien aufgezeigt, bei der Entwicklung transienter Bakteriämien und in der Folge infektiöser Herzerkrankungen wie der Endokarditis eine entscheidende Rolle [17, 52, 53].

Seit Jahren vermuten zudem verschiedene Forscher, dass Bakterien der Mundflora nicht nur bei akut infektiösen Herzerkrankungen eine Rolle spielen, sondern auch in die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen involviert sein könnten [52, 54].

Doch neben diesen klinischen Hinweisen, die deduktiv versuchen die Pathogenese der Aortenklappenstenose zu erklären, existieren auch Tier-Experimente, in denen versucht wurde, über induktives Vorgehen den genauen Mechanismus zu klären.

### Tier-experimentelle Untersuchungen

In einem Tier-Modell von Cohen et.al. 2004 wurde ein Zusammenhang zwischen subklinischer bakterieller Endokarditis und Kalzifikation der Aortenklappe näher betrachtet, indem mehrere Gruppen weißer Hasen mit Kolonien von *Corynebacterium matruchotti* sowie *Strept. sanguis* beimpft und postmortem deren Aortenklappen untersucht wurden. Über 93% der Hasen, die kombinierte Injektionen mit Corynebakterien und Streptokokken erhielten, entwickelten große Kalzifikationen an der Aortenklappe, während in der Kontrollgruppe, die lediglich mit Kochsalz-Infusionen behandelt wurden, kein Nachweis von Kalkablagerungen an der Herzklappe erbracht werden konnte. Die Tiere wurden über eine Zeitdauer von 50 Tagen untersucht, sodass sich die großen Kalzifikationen bereits nach kürzester Zeit entwickeln konnten [55].

### Molekularbiologische Untersuchung

Einen weiteren Hinweis für die Theorie eines Zusammenhangs zwischen bakterieller Infektion und Entwicklung struktureller Herzerkrankungen liefert beispielsweise eine Studie von Nakano et.al.2006, in welcher der PCR-Nachweis genetischen Materials von *Streptokokkus mutans*, einem in der Mundflora residentem Bakterium, in zahlreichen explantierten Herzklappen sowie atheromatösen Plaques erbracht werden konnte [52].

Allerdings konnte in den meisten durchgeführten Studien lediglich die DNA mehrerer bakterieller Spezies in Herzklappengewebe oder atherosklerotischen Ablagerungen [16, 17, 51] und nicht der direkte kulturelle Nachweis der Bakterien erbracht werden.

Daraus ergibt sich die Frage, ob Bakterien auch in der Tiefe von atherosklerotischen und kalzifizierenden Plaques nachgewiesen oder möglicherweise daraus sogar angezüchtet werden können und somit ein direkter Nachweis erbracht werden kann.

### Pathomechanismus der bakteriellen Kalzifikation von Herzklappengewebe

Bakterien sind außerdem in der Lage Verkalkungen zu produzieren, wobei mehrere mögliche Mechanismen identifiziert wurden [56-58]. *Streptokokkus salivarius* und *Streptokokkus sanguinis* sind über die Erhöhung des dentalen pHs, bedingt durch die Aktivität der Arginin-Deaminase, in der Lage Kalkablagerungen aus Harnstoff und Ammoniak zu bilden [56].

Auch *Corynebacterium matruchotii* oder Endokarditiserreger wie *Streptokokkus mutans* sind assoziiert mit einer Mineralisation, die ebenfalls über eine pH-Erhöhung bedingte Ausfällung von Calcium-Phosphat induziert wird [57]. Akute Infektionen hingegen führen zu einem Abfall des pH-Werts im Gewebe, wodurch die Aktivierung des

angeborenen Immunsystems und damit eine Entzündungsreaktion getriggert wird [59]. Obwohl eine azidotische Stoffwechsellage nicht die ideale Lebensbedingung für viele bakterielle Erreger darstellt [60], sind einige Erreger dennoch in der Lage extreme pH-Werte zu überleben [61] und den transienten Stress ideal zu nutzen, indem sie die Bildung von toleranten bakteriellen Persister-Zellen induzieren [62].

Zudem sind einige Erreger, wie z.B. *Strept. tigurinus*, neben der Fähigkeit zur Kalzifikation, auch mit der Entstehung invasiver Infektionen, wie z.B. der aIE, assoziiert [58].

Diese Berichte über den Nachweis von Bakterien in klinisch nicht akut infektiösem Gewebe [16, 51, 54], lassen die Vermutung aufkommen, dass subakute/subklinische bakterielle Infektionen einen Beitrag in diesem aktiven Entzündungsprozess der Pathogenese struktureller Herzklappenerkrankungen leisten.

Es ist unbestritten, dass Bakterien eine Vielzahl von Überlebensstrategien entwickelt haben, um im Gewebe und intrazellulär zu überleben, resp. sich zu vermehren. Für das Herzklappengewebe jedoch wurde noch kein spezifischer Mechanismus nachgewiesen.

#### **2.1.1.5 Bakterielle Überlebensstrategien**

Wie gelingt es den Bakterien allerdings, in den Verkalkungen der strukturell veränderten Herzklappen zu überleben? Dafür lohnt es sich mögliche Überlebensstrategien unterschiedlicher Bakterien und ihre Fähigkeit zur Persistenz im menschlichen Gewebe näher zu betrachten.

Immer wieder kommt es zu persistierenden oder rezidivierenden bakteriellen Infektionen durch bestimmte Bakterien, bei denen, basierend auf wissenschaftlichen Erkenntnissen, bakterielle Persister-Zellen eine bedeutende Rolle spielen [62, 63].

##### *Bakterielle Persister-Zellen: eine alternative Überlebensstrategie*

Bakterielle Persister-Zellen stellen eine kleine phänotypische Variante von sehr langsam oder nicht-wachsenden Zellen einer bakteriellen Population dar, die eine hohe Toleranz gegenüber antibiotischen Substanzen aufweisen [64]. Toleranz bedeutet in diesem Zusammenhang keinesfalls Antibiotika-Resistenz. Transient tolerante bakterielle Persister-Zellen können eine hochdosierte antibiotische Langzeit-Behandlung überleben, obwohl sie gegen die antibiotische Substanz an sich sensibel sind. Nach Beendigung der antibiotischen Therapie sind bakterielle Persister-Zellen wieder in der Lage sich zu teilen,

sodass sie mit dieser evolutionären Strategie das Überleben der Population sichern [61, 65].

Bakterielle Persister-Zellen verschiedener bakterieller Spezies weisen unterschiedliche Mechanismen der Gewebepersistenz auf. So werden beispielsweise Toxin-Antitoxin (TA) - Systeme in *Escherichia coli* in einen engen Zusammenhang mit der Persister-Zell-Bildung gebracht.

In diesem Fall wird das von *E.coli* gebildete toxische HipA Protein durch das HipB Antitoxin neutralisiert, welches wiederum über die sogenannte Lon-Protease abgebaut werden kann. Dies ermöglicht es dem HipA Protein eine Art zelluläre Stilllegung und damit die Bildung von bakteriellen Persister-Zellen zu induzieren [66, 67].

Solche TA-abhängige bakterielle Persister-Zell-Formationen existieren auch im Rahmen chronischer Salmonella oder Pseudomonas- Infektionen [62, 68].

Auch *Staphylococcus aureus* ist in der Lage über die Bildung solcher bakterieller Persister-Zellen eine stationäre Phase zu erreichen, in welcher die Bakterien weitgehend tolerant gegen zahlreiche Antibiotika sind [69].

Diese Strategie der bakteriellen Persister-Zellen wird als sehr heterogen und aus multiplen Mechanismen bestehend gesehen. So kann man eine zeitabhängige Persistenz von einer dosisabhängigen Persistenz unterscheiden, die in einer vorübergehenden Überexpression von Efflux-Pumpen besteht und somit eine Antwort auf transienten Stress darstellt [66]. Bei der Zeit-abhängigen Persistenz kommt er über eine Down-Regulation des Stoffwechsels zu einer verminderten Zellteilung, wodurch beispielsweise bakteriostatische Substanzen ineffektiv werden [70].

### Bakterielle Biofilme

Eine weitere Überlebensstrategie die Bakterien zur Persistenz im menschlichen Gewebe befähigt, ist die Biofilm-Bildung. Auch der wohlbekannteste und gefürchtete Erreger *Staphylococcus aureus* zählt zu den Biofilm-bildenden Bakterien. Biofilme stehen mit einer Vielzahl an Staphylokokken-assoziierten Infektionen, wie Osteomyelitis, chronischen Wundinfektionen oder der Endokarditis, im Zusammenhang [71-73].

Biofilme können aus einer Vielzahl von Adhäsionsproteinen, Exopolysacchariden oder Extrazellulärer DNA sowie einer Kombination daraus bestehen. Biofilme schützen die Bakterien vor einem Angriff des Komplementsystems oder der Phagozytose und gelten als relativ tolerant gegenüber antibiotischer Durchdringung [74, 75].

Erkenntnisse von Keren et.al. 2004 legen nahe, dass bakterielle Persister-Zellen auch in Biofilmen nachweisbar sind und diese Kombination aus Biofilm und residenten

bakteriellen Persister-Zellen als additive Überlebensstrategie zu verstehen ist [76]. So könnte es sein, dass möglicherweise genau diese bakteriellen Persister-Zellen, nach Induktion der Inflammation und Anlagerung an das Herzklappengewebe, dort persistieren und somit die Pathogenese struktureller Herzerkrankungen mitbedingen.

#### Bakterielle Exo- und Endoproteine

Ein weiterer Mechanismus, der in die Pathogenese struktureller Herzklappenveränderungen involviert sein könnte, ist die Freisetzung von bakteriellen Proteinen.

*Staphylokokkus aureus*, ein häufiger Erreger der sowohl ambulant als auch nosokomial erworbenen, akut infektiösen Endokarditis [77, 78], ist in der Lage das sogenannte  $\beta$ -Toxin freizusetzen [79].

Über die Bildung von  $\beta$ -Toxin ist das Bakterium in der Lage humane Herzendothelzellen direkt zu schädigen [80]. Vorgeschädigte Endothelzellen ermöglichen es den Bakterien sich an der Herzklappe anzulagern und über die sekundäre Freisetzung von Adhäsionsfaktoren Thrombozyten zu rekrutieren und eine Aggregation dieser zu induzieren. Dadurch werden die Umgebungsbedingungen an der Herzklappe für die Bakterien angepasst [81]. Das freigesetzte  $\beta$ -Toxin hat zwei enzymatische Aktivitäten und kann im Sinne eines Janusgesichts einer Sphingomyelinase und einer Biofilm-Ligase entsprechen. Das  $\beta$ -Toxin ist einerseits in der Lage über die Sphingomyelinase-Aktivität Immunzellen zu töten sowie über die Aktivität der Biofilm-Ligase eine Biofilmbildung zu initiieren. Dem  $\beta$ -Toxin wird außerdem die Fähigkeit zugesprochen, die Interleukin-8 Produktion in humanen Herzendothelzellen zu inhibieren und somit den lokalen Immunprozess zu hemmen [80].

Die genannten Mechanismen fördern die Bildung von lokalen septischen Thromben, in welchen *Staphylococcus aureus* möglicherweise vor dem Immunsystem geschützt wird [81].

Wie diese zahlreichen Studien nahelegen, handelt es sich bei der Pathogenese der Aortenklappenstenose wohl um ein multifaktorielles Geschehen, deren Mechanismus noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

All diese obengenannten Mechanismen werden in der Pathogenese der akuten Herzklappenerkrankungen beschrieben und stärken die Hypothese, dass Bakterien einen wesentlichen Beitrag in der Entwicklung und Progression chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen wie der Aortenklappenstenose leisten.

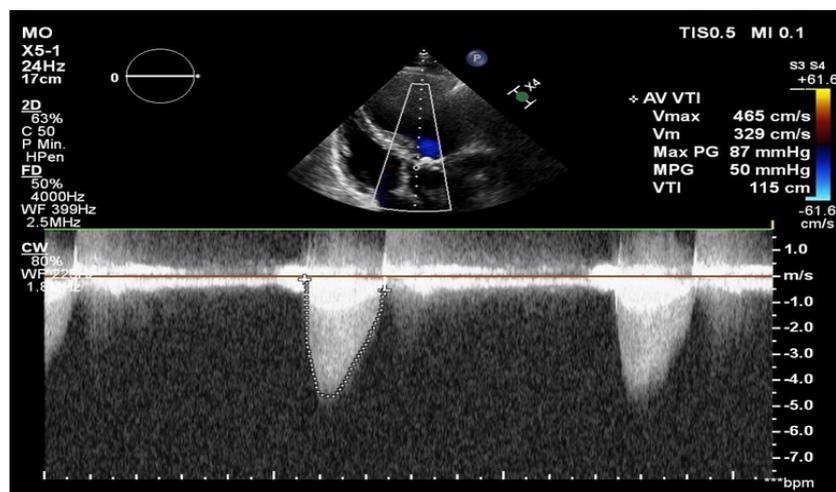
Diese multiplen Überlebensstrategien wie die genannten toleranten bakteriellen Persister-Zellen oder die Bildung von Biofilmen sowie die Freisetzung von bakteriellen Proteinen und der dadurch bedingten Veränderung der Umgebungsbedingungen, sind als Bestandteil der Pathogenese von strukturellen Herzklappenerkrankungen durchaus denkbar. Unterschiedliche pathogenetische Mechanismen beeinflussen die klinische Klassifikation und somit indirekt auch therapeutische Entscheidungen. Dies bedeutet, dass unterschiedlich klassifizierte Stadien auch auf unterschiedliche Pathogenesen zurückgeführt werden können.

### 2.1.2 Klassifikation der Aortenklappenstenose

Das Spektrum der Aortenklappenverkalkung reicht von leicht und mittelgradiger, meist noch asymptomatischer Stenose, bis hin zur Entwicklung einer schweren Stenose mit dadurch bedingter Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes, welche sich sowohl asymptomatisch als auch mit unspezifischen Symptomen zeigen kann [82]. Echokardiographisch gelingt sowohl die Diagnosestellung als auch die Unterscheidung der 3 Schweregrade einer Aortenklappenstenose.

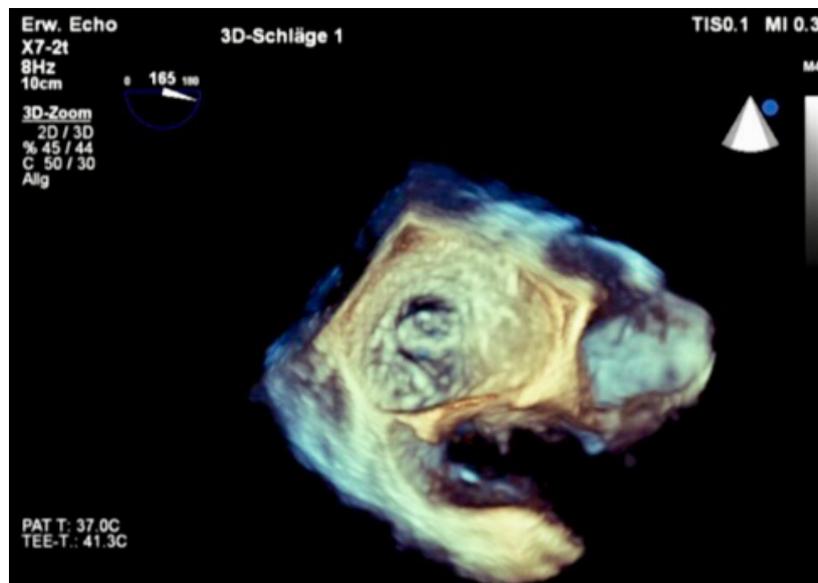
Dabei spielt die errechnete Klappenöffnungsfläche, die maximale Flussgeschwindigkeit, als auch der maximale transaortale Druckgradient eine Rolle [83].

Von einer schweren Aortenklappenstenose kann bei einer Klappenöffnungsfläche von  $\leq 1,0 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ , einem mittleren Druckgradienten von  $\geq 40 \text{ mmHg}$  oder einer maximalen Flussgeschwindigkeit des transaortalen Blutflusses von  $\geq 4 \text{ m/s}$  gesprochen werden [84].



**Abbildung 5:** Klinisch relevanter präoperativer echokardiographischer Aortenklappenbefund eines 62-jährigen Patienten mit hochgradiger Klappenstenose mit einem maximalen Druckgradienten von  $\Delta P \geq 40 \text{ mmHg}$ .

Die echokardiographische 3D-Rekonstruktion (Abb.6) der verkalkten Aortenklappe erlaubt außerdem die räumliche Zuordnung innerhalb anatomischer Strukturen und deren Korrelation mit physiologischen und pathophysiologischen Veränderungen [85].



**Abbildung 6:** Präoperative dreidimensionale echokardiographische Rekonstruktion der massiv verkalkten, stenosierten Aortenklappe, des in Abbildung 5 erwähnten 62-jährigen Patienten aus der sVHD-Kohorte.

In den aktuellen amerikanischen Leitlinien zur Behandlung von Aortenklappenstenosen wird die Aortenklappenstenose außerdem in 4 Stadien eingeteilt:

Stadium A beinhaltet die bikuspidale Aortenklappe und eine echokardiographisch nachgewiesene Aortensklerose, Stadium B eine milde oder moderate Aortenstenose, Stadium C und D sprechen von einer hämodynamisch schweren AS ohne bzw. mit Symptomen [86].

Studien zeigen allerdings, dass neben den drei zuvor genannten Kriterien, auch der Schlagvolumenindex, als Maß für die linksventrikuläre Funktion und Leistung, v.a. hinsichtlich seiner Bedeutung als unabhängiger Prädiktor für die Mortalität der Patienten mit Aortenstenose bei der Klassifikation berücksichtigt werden sollte [87].

Einige Patienten mit symptomatischer AS weisen niedrige Flussraten, ausgelöst durch linksventrikuläre Dysfunktion oder stark erhöhte Nachlast, auf [88]. Daher wird die schwere Aortenklappenstenose in den amerikanischen und europäischen Leitlinien zur Behandlung von Klappenerkrankungen weiter in vier Untergruppen unterteilt. Diese Unterteilung berücksichtigt die Fluss- und Druckgradienten über der Aortenklappe: Normaler Fluss/Niedriger Gradient (NF/LG), Normaler Fluss/Hoher Gradient (NF/HG),

Niedriger Fluss/ Niedriger Gradient (LF/LG) und Niedriger Fluss/Hoher Gradient (LF/HG). Dabei wird „Low flow“ als ein Schlagvolumenindex  $\leq 35 \text{ml/m}^2$  und „Low gradient“ als Druckgradient  $\leq 40 \text{mmHg}$  definiert. [89, 90] Diese Gruppen unterscheiden sich klinisch in ihren Behandlungsstrategien und Outcomes [87].

**Tabelle 1:** Graduierung der Aortenklappenstenose nach aktuellen amerikanischen Leitlinien nach Nishimura et.al. [91].

Stadium	Definition	Klappen Anatomie	Hämodynamik	Hämodyn. Konsequenz	Symptome
<b>A</b>	Risiko für AS	-bikuspide Aortenklappe (andere angeb. Vitien) - Aortensklerose	- Vmax $< 2 \text{m/s}$	Keine	Keine
<b>B</b>	Progressive AS	- milde – moderate Klappensegel-Kalzifikation mit milder Reduktion der Klappenbeweglichkeit -rheumatisch bedingt Klappenveränderung mit Fusion der Kommissuren	-milde AS: Vmax $2,0\text{-}2,9 \text{m/s}$ oder mittlerer Druckgradient ( $\Delta P$ ) $< 20 \text{mmHg}$ -moderate AS: Vmax $3,0\text{-}3,9 \text{m/s}$ oder $\Delta P$ $20\text{-}39 \text{mmHg}$	-ev. frühe LV diastolische Dysfunktion -normale LVEF	Keine
<b>C: Asymptomatische schwere AS</b>					
<b>C1</b>	Asymptomatische schwere AS	-schwere Klappensegel-Kalzifikation oder kongenitale Stenose mit stark eingeschränkter Klappenöffnung	-Vmax $\geq 4 \text{m/s}$ oder $\Delta P \geq 40 \text{mmHg}$ -Klappenöffnungsfläche $\leq 1 \text{cm}^2$ (oder $\leq 0,6 \text{cm}^2/\text{m}^2$ ), -sehr schwere AS bei Vmax $\geq 5 \text{m/s}$ oder $\Delta P \geq 60 \text{mmHg}$	-LV diastolische Dysfunktion -milde LV Hypertrophie -normale LVEF	Keine
<b>C2</b>	Asymptomatische schwere AS mit LV Dysfunktion	-schwere Klappensegel-Kalzifikation oder kongenitale Stenose mit stark eingeschränkter Klappenöffnung	-Vmax $\geq 4 \text{m/s}$ oder $\Delta P \geq 40 \text{mmHg}$ -Klappenöffnungsfläche $\leq 1 \text{cm}^2$ (oder $\leq 0,6 \text{cm}^2/\text{m}^2$ )	-LVEF $< 50\%$	Keine
<b>D: Schwere symptomatische AS</b>					
<b>D1</b>	Schwere symptomatische hoch-Gradient AS (HG)	-schwere Klappensegel-Kalzifikation oder kongenitale Stenose mit stark eingeschränkter Klappenöffnung	-Vmax $\geq 4 \text{m/s}$ oder $\Delta P \geq 40 \text{mmHg}$ -Klappenöffnungsfläche $\leq 1 \text{cm}^2$ (oder $\leq 0,6 \text{cm}^2/\text{m}^2$ ), ev. größer bei kombinierter AS/AI	-LV diastolische Dysfunktion -LV Hypertrophie -ev. Pulmonaler Hypertonus	-belastungsabhängige Dyspnoe; reduzierte Leistungsfähigkeit -belastungsabhängige AP-Beschwerden -belastungsabhängige Synkopen oder Präsynkopen
<b>D2</b>	Schwere symptomatische Niedriger-Fluss/Niedriger Gradient AS (LF/LG) mit reduzierter LVEF	-schwere Klappensegel-Kalzifikation oder kongenitale Stenose mit stark eingeschränkter Klappenbeweglichkeit	-Klappenöffnungsfläche $\leq 1 \text{cm}^2$ mit Vmax $< 4 \text{m/s}$ oder $\Delta P < 40 \text{mmHg}$ -Dobutamin-Stressecho zeigt eine Klappenöffnungsfläche $\leq 1 \text{cm}^2$ mit Vmax $\geq 4 \text{m/s}$	-LV diastolische Dysfunktion -LV Hypertrophie -LVEF $< 50\%$	-Herzinsuffizienz -AP-Beschwerden -Synkopen oder Präsynkopen
<b>D3</b>	Schwere symptomatische Niedrig-Gradient AS (LG) mit normaler EF, oder paradoxer Niedrig-Fluss (LF) AS	-schwere Klappensegel-Kalzifikation oder kongenitale Stenose mit stark eingeschränkter Klappenbeweglichkeit	-Klappenöffnungsfläche $\leq 1 \text{cm}^2$ mit Vmax, $< 4 \text{m/s}$ oder $\Delta P < 40 \text{mmHg}$ - $\leq 0,6 \text{cm}^2/\text{m}^2$ -Schlagvolumenindex $< 35 \text{ml/m}^2$	-verdickte relative linksventrikuläre Wanddicke -kleiner linker Ventrikel mit niedrigem Füllungsvolumen -gestörte diastolische Füllung -LVEF $\leq 50\%$	-Herzinsuffizienz -AP-Beschwerden -Synkopen oder Präsynkopen

In mehreren Studien zeigten sich die NF/LG Patienten mit der besten Prognose und den wenigsten kardialen Ereignissen. Die Gruppe mit den niedrigen Flussraten und niedrigen Druckgradienten (LF/LG) zeigten in einigen Studien ein schlechteres Outcome [88, 92]. Allerdings existieren auch Studien, in denen für Patienten mit AS mit hohem Druckgradienten (HG) eine deutlich schlechtere Prognose im Vergleich zu den LF/LG Stenosen nachgewiesen wurden [93, 94]. Insgesamt wird der besondere Stellenwert der LF/LG Stenosen in Bezug auf die Behandlungsstrategien immer wieder kontrovers diskutiert, wobei in einer Metaanalyse mehrerer Studien ein signifikant besseres Überleben durch operatives Management im Gegensatz zur rein konservativen Therapie dargestellt werden konnte [95].

Vorstellbar ist, dass sich dieser Überlebensvorteil durch die chirurgische Explantation der Klappe und damit der potenziellen Elimination der bakteriellen Persister-Zellen und Biofilme ergibt. Eindeutige Beweise des Zusammenhangs bleibt die Literatur jedoch schuldig. Der eigene Forschungsansatz geht v.a. der Frage nach, in wie viel Prozent der strukturell veränderten Herzklappen mit einem klassifizierten Grad 2-3° ein mikrobiologischer resp. molekularbiologischer Nachweis von Erregern möglich ist. Es bleibt zu vermuten, dass der Nachweis von Erregern in den strukturellen Herzklappenerkrankungen sowohl im diagnostischen als auch therapeutischen Bereich Änderungen hervorrufen wird.

Bis jetzt besteht eine Klasse IB/C Indikation zum operativen Klappenersatz, laut aktuellen amerikanischen und europäischen Leitlinien 2017 [10, 89] lediglich für Patienten mit hochgradiger symptomatischer AS, Patienten mit Indikation zur ACB-OP oder OP der Aorta ascendens oder anderer Herzklappen, Patienten mit hochgradiger AS und LVEF <50%, oder asymptomatischen Patienten mit AS und pathologischen Belastungstests. Für LF/LG Stenosen liegt hingegen nur eine IIa Empfehlung und für milde sowie moderate Aortenklappenstenose überhaupt keine Operationsindikation vor [89, 90]. Obwohl Leitlinien viele Entscheidungshilfen zur Behandlung liefern können, muss jeder Patient individuell hinsichtlich seines Risikos und Nutzen evaluiert werden, sodass in vielen Fällen nicht pauschal eine Operationsindikation anhand der Leitlinien gestellt werden kann [89].

Die eigene wissenschaftliche Arbeit legt die Grundlage für zukünftige Überarbeitungen der Klassifikationsmodelle, sofern ein Zusammenhang zwischen Infektion, bakteriellen Persister-Zellen und chronisch strukturellen Veränderungen der Herzklappe nachgewiesen werden kann.

## 2.2 Strukturelle Herzklappenerkrankung versus akut infektiöse Endokarditis

### Gemeinsamkeiten der akut infektiösen Endokarditis und chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen

Die akut infektiöse Endokarditis, eine meist durch Bakterien verursachte Entzündung des Herzklappengewebes, stellt eine seltene, aber schwerwiegende Erkrankung dar, die, ähnlich wie die unbehandelte schwere Aortenklappenstenose [96], mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden ist [97]. Es handelt sich um eine systemische Erkrankung, die mit zahlreichen Komplikationen neurologischer, rheumatischer oder internistischer Natur assoziiert ist [98]. Wie auch bei chronisch strukturellen Herzklappenerkrankungen gilt der operative Herzklappenersatz als wichtige therapeutische Option, sodass in 50% der Endokarditisfälle [99] eine antibiotische Therapie nicht ausreicht und so die Indikation zum operativen Klappenersatz frühzeitig gestellt werden muss. Dennoch liegt die Im-Krankenhaus-Mortalität der Patienten mit infektiöser Endokarditis bei Infektion mit beispielsweise *Staphylococcus aureus* trotz Behandlung bei bis zu 20-30% [100, 101]. Wie zuvor genannt, sind Bakterien auch in kürzester Zeit in der Lage Kalzifikationen am Herzklappengewebe zu bilden [55], sodass möglicherweise intraoperativ makroskopisch eine akute Infektion von einer chronischen Klappenveränderung nicht eindeutig zu differenzieren ist. Würden suspekta Herzklappen mit intraoperativ morphologischen Hinweisen auf eine infektiöse Genese der Klappenveränderung standardmäßig auf ursächliche bakterielle Erreger untersucht werden, könnten Hochrisiko-Gruppen identifiziert werden, die von einer postoperativen Weiterbehandlung möglicherweise profitierten.

### Wesentliche Unterschiede zwischen aIE und sVHD

Die aIE stellt sich klinisch nicht immer eindeutig dar, sodass sie sich sowohl in einer akuten, sehr schnell fortschreitenden Infektion als auch als subakut oder chronisch verlaufende Erkrankung mit nur milden und sehr unspezifischen Symptomen äußern kann [102]. Ein Großteil der Patienten zeigt Allgemeinsymptome wie Fieber, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust, häufig können auch pathologische Herzgeräusche auskultiert werden [99].

Während strukturelle Herzklappenerkrankungen meist allein über echokardiographische Methoden diagnostiziert werden können [83], geschieht die Diagnose der akut infektiösen Endokarditis in der klinischen Praxis über die modifizierten Duke Kriterien, welche

klinische, mikrobiologische und echokardiographische Befunde beinhalten und in Haupt- sowie Nebenkriterien unterteilt werden [103].

Die aktuellen europäischen Leitlinien zur Behandlung von nicht infektiösen Herzklappenerkrankungen sehen keine mikrobiologische Diagnostik vor [104], da die Hypothese einer infektiösen Pathogenese struktureller Herzklappenerkrankungen in die diagnostischen Entscheidungen noch nicht integriert ist [10]. Aber auch in bis zu 30% aller aIE kann über mikrobiologische Diagnostik kein Erreger nachgewiesen werden [105].

Die meisten Endokarditiden werden durch *Staphylococcus aureus*, gefolgt von *Streptococcus viridans*, *Enterokokken* und *Koagulase-negative Staphylokokken* verursacht [106], sodass die Hypothese eines Zusammenhangs von subklinischer Infektion und der Entwicklung chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen, ähnliche Erreger in der Pathogenese vermuten lässt.

Die Identifikation des auslösenden Erregers ist essentiell für die Auswahl und Dauer der Therapie und beeinflusst somit das Überleben der Patienten [44]. Bei chirurgisch behandelten Patienten mit aIE besteht die Möglichkeit den auslösenden Erreger direkt in explantiertem Klappen-Gewebe nachzuweisen, sodass auch bei Blutkultur-negativer Endokarditis eine Erregerisolation gelingt [107]. Die histopathologische Untersuchung der explantierten Herzklappe erreicht eine Sensitivität von bis zu 84% [108], während die Kultur explantierter Herzklappen eine sehr niedrige Sensitivität von rund 25% besitzt und anfällig für falsch positive Ergebnisse durch Kontamination ist [107-109]. Die niedrige Sensitivität der kulturellen Erregerdiagnostik kann zum einen daran liegen, dass einige Patienten bereits präoperativ antibiotisch behandelt wurden und zum anderen an dem Vorhandensein von schlecht- oder nicht-kultivierbaren Erregern im Klappen-Gewebe [110].

Molekularbiologische Verfahren wie Next-Generation Sequencing oder Breit-Spektrum PCR-Methoden sind nicht nur sensitiver, spezifischer und schneller als die Gewebekultur, sondern außerdem in der Lage den Großteil des Spektrums typischer Endokarditis-Erreger auch in Patienten mit Blutkultur-negativer Endokarditis zu identifizieren [111]. Durch Anwendung dieser Methoden konnte via 16S-rDNA gezeigt werden, dass die aIE durch einen polymikrobiellen Erregerbefall charakterisiert ist [44]. Dennoch wird die 16S-rDNA-PCR für die Diagnose einer infektiösen Endokarditis noch nicht flächendeckend oder standardmäßig in Europa eingesetzt [110-112].

Studien weisen darauf hin, dass durch die Kombination aus standardmäßig durchgeführter Gewebekultur und PCR-Sequenzierungsmethoden die diagnostische Sensitivität erhöht und damit die postoperative Therapie verbessert werden kann [44]. Da in einigen Studien in der Blutkultur andere Erreger als über PCR-Nachweis in der explantierten Klappe identifiziert werden konnten, sind möglicherweise in manchen Fällen die über BK nachgewiesenen Erreger nicht ursächlich für die endotheliale Entzündung der Klappe, wodurch auch die hohe Mortalität der aIE trotz antibiotischer Therapie erklärt werden könnte [44, 113].

Aus all diesen Erkenntnissen werden folgende Aspekte in der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit adressiert:

1. Wenn die Pathogenese struktureller Herzklappenerkrankungen u.a. einen infektiösen Ursprung hat und bakterielle Erreger wirklich in der Tiefe der Kalzifikationen schlummern, müsste der Nachweis des genetischen Materials dieser Bakterien über sensitive Sequenzierungsmethoden möglich sein.
2. Wenn bakterielle Persister-Zellen in strukturellen Herzklappenveränderungen vorhanden sind, müssten neben dem molekularbiologischen Erregernachweis, einige dieser Klappen, wenn auch, aufgrund des reduzierten Stoffwechsels und langsamen Wachstums erschwert, anzüchtbar sein.
3. Die identifizierten Bakterien sollten immunhistologisch intramural im Herzklappengewebe nachgewiesen werden.
4. Die immunhistologische Darstellung der sVHD-Pathologie sollte sich jedoch wesentlich von der aIE-Pathologie abgrenzen lassen.
5. Das klinische Outcome der Patienten mit struktureller Herzklappenerkrankung sollte sich auch im Hinblick auf postoperative Beatmungsdauer, Nierenersatzverfahren, ECMO-Anlage, Tracheotomie, Herzrhythmusstörungen, Schrittmacherimplantation, Sepsis und Re-Intervention wesentlich von der aIE unterscheiden.
6. In zusammenfassender Darstellung muss diskutiert werden, welchen Stellenwert die molekularbiologische Diagnostik für die Pathogenese der sVHD hat und ob sich ggf. therapeutische Konsequenzen daraus ergeben.

### 3 Problemstellung

Mit dem Hintergrund sensitive serologische und molekularbiologische Analyseverfahren, wie die Metagenomanalyse infizierter Herzklappen künftig in die klinische Routine zu integrieren, um eine bessere Erregeridentifikation zu erreichen und damit die Diagnosestellung zu erleichtern, wurde 2016 an der Herzchirurgischen Poliklinik in Großhadern die Untersuchung explantierter infizierter Herzklappen begonnen. Da es intraoperativ häufig makroskopische Ähnlichkeiten zwischen den Vegetationen einer akut infektiösen Endokarditis und Ablagerungen in kalzifizierenden Aortenklappenstenosen gibt und auch mehrere Studien, wie oben genannt, auf den Zusammenhang zwischen subakuter Endokarditis und der Entwicklung struktureller Herzklappenerkrankungen hinweisen, stellten sich folgende Fragen in Bezug auf eine infektiöse Pathogenese struktureller Herzklappenerkrankungen:

1. Bei welchem Prozentsatz an zufällig ausgewählten Patienten mit sVHD können typische Endokarditiserreger wie *Staphylococcus aureus*, *Streptokokken* oder *Enterokokken* nachgewiesen werden, ausgehend von einer infektiösen Pathogenese als Ursache chronisch struktureller Herzklappenerkrankung?
2. In wie viel Prozent der Population unterstützt die mikrobiologische bzw. molekularbiologische Diagnostik?
3. Sind die molekularbiologischen Expressionsraten der jeweiligen Erreger quantitativ vergleichbar derer einer aIE?
4. Sind die Erreger histomorphologisch intramural im Herzklappengewebe von chronisch strukturellen Herzklappenerkrankungen nachweisbar?
5. Unterscheiden sich die immunhistologischen und histochemischen Befunde des Herzklappengewebes von Patienten mit aIE von denen mit sVHD?
6. Unterscheidet sich das Patientenkollektiv mit sVHD und positivem molekularbiologischen Befund in den Parametern des intra- und postoperativen Outcomes von Patienten mit sVHD ohne Erregernachweis?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

Für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit wurden nachfolgend aufgelistete Materialien verwendet.

#### 4.1.1 Farbstoffe, Antikörper, Lösungsmittel

*Tabelle 2: Auflistung der in der Immunhistochemie verwendeten Farbstoffe, Antikörper und Lösungsmittel*

<b>Farbstoffe</b>	
Hexidiumiodid 1: 500	<i>Molecular Probes, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)</i>
SYTO 13 1: 200	<i>Molecular Probes, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)</i>
<b>Antikörper</b>	
Anti-Staphylococcus aureus-Antikörper (704 1: 100; ab37644)	<i>Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)</i>
CD14-Antikörper (1: 200; NBP1-40683)	<i>Novus Biologicals Europe (Abingdon, Vereinigtes Königreich)</i>
CEACAM -6 / CD66c-Antikörper (1: 100; NB100-65005)	<i>Novus Biologicals Europe (Abingdon, Vereinigtes Königreich)</i>
Alexa Fluor 488 (1: 50)	<i>Invitrogen, Life Technologies (Eugene, OR, USA)</i>
Alexa Fluor 647 (1: 500)	<i>Dianova (Hamburg, Deutschland)</i>
<b>Lösungsmittel</b>	
Target Retrieval Solution pH 9,0	<i>Dako (Carpinteria, Kalifornien, USA)</i>
Go Taq G2 Green Master Mix	<i>Promega Corporation (Madison, WI, USA)</i>

#### 4.1.2 Primer und Kits

**Table 3:** Auflistung der verwendeten Primer zum molekularbiologischen Erregernachweis aus dem Herzklappengewebe sowie notwendige DNA-Isolations-Kits

<b>Primer und Sonden</b>	
<b>Staph. aureus</b>	
saur-F: CAA AGC ATC CTA AAA AAG GTG TAG AGA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
saur-R: TTC AAT TTT CTT TGC ATT TTC TAC CA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
saur-S: [FAM] TTT TCG TAA ATG CAC TTG CTT CAG GAC CA [BHQ1]	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<b>Propionibacterium acnes</b>	
GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
TTCCGACGCGATCAACCA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
FAM-AGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG- TAMRA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<b>Enterococcus faecalis</b>	
GACAGGAAAGAACTAGGAGGAC	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
AAACAGACACATCGTGCT	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
FAM-CACTTCTGCCGCCATACAACAA- TAMRA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<b>Enterococcus faecium</b>	
CGTAGCATTCTATGATTATGAAGCC	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)

Tabelle 4: Weiterführung der Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primer sowie der DNA-Isolations-Kits

<b>Primer</b>	
<b>Enterococcus faecium</b>	
CATCGTGTAAGCTAACTTCG	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
FAM-CAGATTCCAGCCGAAGTGCC-TAMRA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<b>Streptococcus pyogenes</b>	
GGRACACGTACCCAAAATGTAGGA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) Eurofins Genomics
TCTTGAGCTCTTTGTTCCGGTRTAG	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
FAM-CGTGACCAAAAAGGCGGCATGC-TAMRA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<b>Clostridium difficile</b>	
GAA GCT ACT AAG GGT ACA AA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
GGT CTA TTC CTA CTT CTA ATG C	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
FAM-ATA AGA GGT GAA ACT TCT CCT GTA AAT GCT CC-TAMRA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<b>Kits</b>	
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QuantiNova SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### 4.1.3 Kulturmedien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kulturmedien

<b>Kulturmedium</b>	<b>Firma</b>
Hirn-Herz-Infusions-Bouillon (BHI)	OXOID. (Hampshire, England)
5% Fildes-Extrakt	OXOID (Hampshire, England)
Columbia-Agar mit 5% Schafblut	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Columbia-Agar mit gekochtem Blut und IsoVitalax	BD BBL (Le Pont de Claix, Frankreich)

**Tabelle 6:** Weiterführung der Tabelle 4; Auflistung der verwendeten Kulturmedien

<b>Kulturmedium</b>	<b>Firma</b>
Endo-Agar	<i>Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)</i>
Aesculin-Agar	<i>OXOID (Hampshire, England)</i>
Sabouraud-2% -Glucose-Agarplatten	<i>Sifin diagnostics GmbH (Berlin Deutschland)</i>
Brucella-Agar	<i>BD BBL (Le Pont de Claix, Frankreich)</i>
GenBag	<i>BioMérieux (Marcy L'Étoile, Frankreich)</i>

#### 4.1.4 Geräte und Software

**Tabelle 7:** Auflistung der verwendeten Geräte und Software

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Zeiss LSM-5 Pascal-Laser-Scanning-Mikroskop	<i>Carl Zeiss (Jena, Deutschland)</i>
Automatischer Gewebeprozessor TP1020	<i>Leica Biosystems Nussloch GmbH, (Wetzlar, Deutschland)</i>
BactoSonic®	<i>BANDELIN electronic GmbH &amp; Co.KG (Berlin, Deutschland)</i>
VITEK® MALDI-ToF MS	<i>BioMérieux Inc. (Durham, NC, USA)</i>
Etest AB	<i>Biodisk (Solna, Schweden)</i>
Cryobank TM	<i>Mast Diagnostica GmbH (Reinfeld, Deutschland)</i>
BacT / ALERT 3D	<i>BioMérieux Inc. (Durham, NC, USA)</i>
<b>Software</b>	
Open-Source-Software ImageJ	<i>NIH-Image, National Institutes of Health, Bethesda (MD, USA)</i>
GraphPad Prism 7.0	<i>GraphPad Software, (La Jolla, CA, USA)</i>
KardioSoft 2018	<i>itroxx GmbH (München, Deutschland)</i>

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine multizentrische prospektive Kohortenstudie, bei der im Zeitraum von März 2016 bis Juni 2017 Patienten mit akut infektiöser Endokarditis (aIE) sowie Patienten mit struktureller Herzklappenerkrankung (sVHD) und Indikation zum operativen Klappenersatz rekrutiert wurden. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde ein Ethikantrag (20-572, Oktober 2015) an die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU gestellt, welcher geprüft und genehmigt wurde.

Alle in die Untersuchungen eingeschlossenen Patienten lieferten ihre schriftliche Einverständniserklärung ab.

### 4.2.2 Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial

Für die Studie kamen alle Patienten mit Indikation zum operativen Herzklappenersatz, die im Zeitraum vom 02.03.16 – 24.06.17 in der Herzchirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern operiert wurden, in Frage.

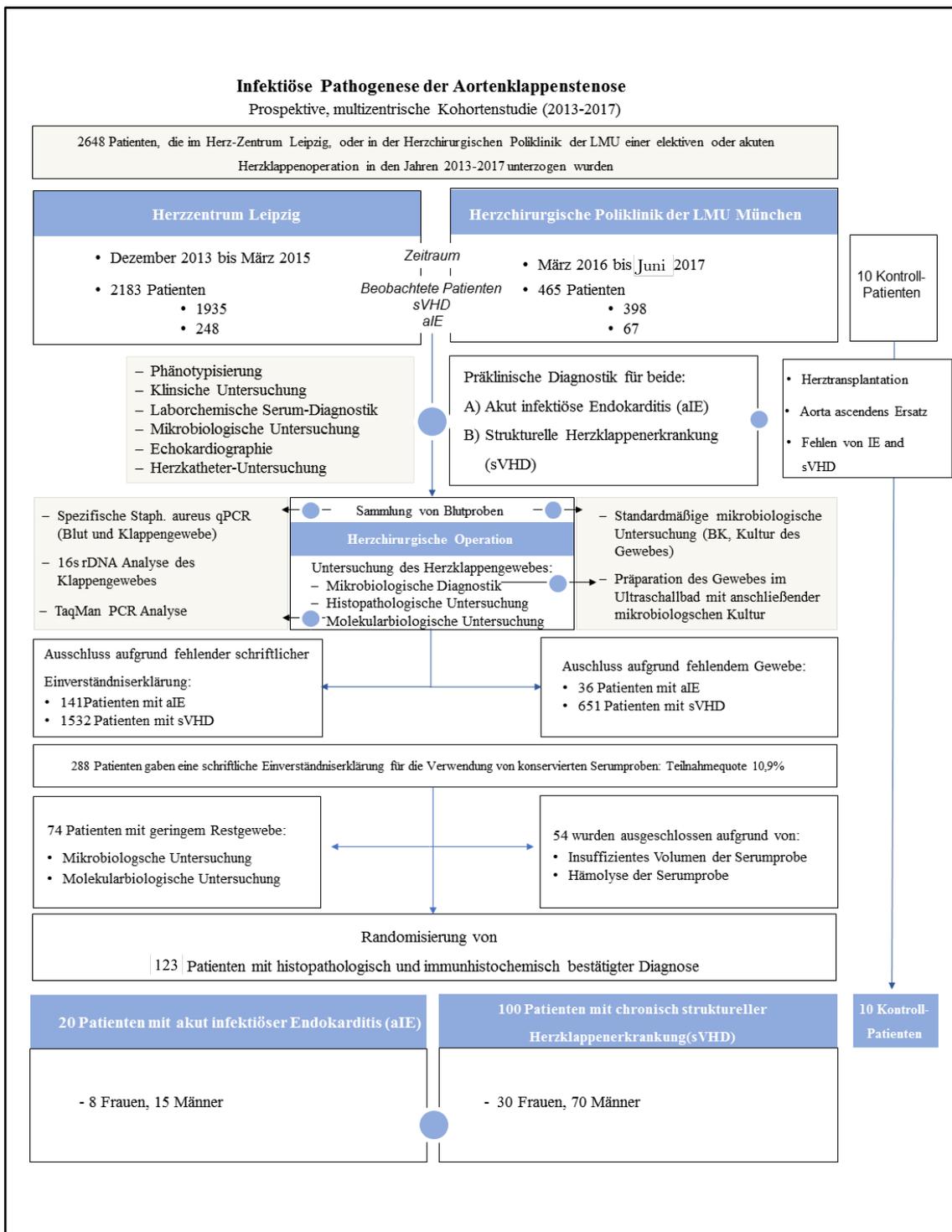
Im genannten Zeitraum wurden in beiden Standorten (Großhadern + Klinikum Augustinum) der herzchirurgischen Klinik der LMU bei 465 Patienten ein Herzklappenersatz durchgeführt.

Für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit wurden 3 Patienten-Kohorten gebildet, die folgendermaßen definiert werden:

**Kohorte sVHD:** Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung

**Kohorte aIE:** Patienten mit akut infektiöser Endokarditis

**Kohorte Kontrollgruppe:** Kontrollgruppe aus Patienten mit Indikation zur herzchirurgischen Operation OHNE akuter/chronischer Herzklappenerkrankung



**Abbildung 7:** Fluss-Diagramm der Patienten-Rekrutierung und Materialgewinnung. Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine multizentrische prospektive Kohortenstudie im Zeitraum März 2016 – Juni 2017 am Klinikum der Universität München sowie im Zeitraum Dezember 2013 bis März 2015 am Universitätsklinikum Leipzig. Es erfolgte eine Randomisierung von 100 sVHD-Patienten sowie 23 aIE-Patienten, die histopathologischen, mikrobiologischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen unterzogen wurden.

Für alle drei Kohorten wurden Ein- und Ausschlusskriterien definiert, die nachfolgend aufgelistet werden.

***Kohorte sVHD: Ein- und Ausschlusskriterien***

In die Kohorte sVHD wurden alle Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung und Indikation zum operativen Herzklappenersatz eingeschlossen. Folgende Kriterien führten zum Ausschluss der Patienten:

- Fehlendes Gewebe / Blut aufgrund organisatorischer Probleme
- Fehlende Einverständnis der Patienten
- Operationen der Trikuspidal, - bzw. Pulmonalklappe
- Rekonstruktion der Herzklappe

Unter Berücksichtigung dieser Ausschlusskriterien konnten insgesamt 253 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, von denen schließlich 100 Patienten zur detaillierten Untersuchung und Auswertung, anhand des Statistikprogramms SPSS, randomisiert wurden.

***Kohorte aIE: Ein- und Ausschlusskriterien***

Freundlicherweise wurden zudem Patientendaten + Gewebe von Patienten mit akut infektiöser Endokarditis (n=23) aus dem Universitätsklinikum Leipzig zur Verfügung gestellt.

Patienten mit folgenden Kriterien wurden in die Kohorte 2 eingeschlossen:

- Diagnose einer Endokarditis anhand der modifizierten Duke-Kriterien
- Mikrobiologischer Klappennachweis für *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Cutibacterium acnes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* und *Clostridium difficile*

Die modifizierten Duke-Kriterien beinhalten klinische, mikrobiologische und echokardiographische Befunde und werden in Haupt- sowie Nebenkriterien unterteilt [103]. Sind 2 Hauptkriterien oder 1 Hauptkriterium + 3 Nebenkriterien oder 5 Nebenkriterien positiv, kann man von einer definitiven IE sprechen [114].

**Tabelle 8:** Darstellung der modifizierten Duke-Kriterien nach Li [114]

Hauptkriterien	
<i>Positive Blutkulturen</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endokarditis-typische Erreger aus zwei separaten Blutkulturen (<i>Staph. aureus</i>, <i>Strept.bovis</i>, <i>Viridans-Strept.</i>, <i>HACEK</i>, <i>Enterokokken</i>)</li> <li>- Erreger in persistierenden positiven Blutkulturen (Blutkulturen mit mehr als 12 Stunden Abstand; 3 oder mehr als die Hälfte von mind. 4 BK, wobei die erste und letzte in einem Abstand von mind. 1 Stunde entnommen wurden.)</li> <li>- positive BK mit <i>Coxiella burnetii</i> oder IgG AK Titer &gt; 1:8000</li> </ul>
<i>Echokardiographische Endokardbeteiligung</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- intrakardiale oszillierende Masse auf Prädilektionsstellen</li> <li>- Abszess</li> <li>- neue teilweise Dehiszenz einer Klappenprothese</li> <li>- neue Klappeninsuffizienz</li> </ul>
Nebenkriterien	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prädisponierende Herzerkrankung oder i.v. Drogenabusus</li> <li>- Fieber &gt; 38,0°C</li> <li>- vaskuläre Befunde: arterielle Embolien, mykotische Aneurysmen, septische pulmonale Embolien, intrakranielle oder konjunktivale Hämorrhagien, Janeway-Läsionen</li> <li>- immunologische Phänomene: Glomerulonephritis, Osler-Knötchen, Roth-Spots, Rheumafaktoren</li> <li>- positive BK mit Nachweis nicht Endokarditis-typischer Erreger</li> <li>- echokardiographischer Hinweis für eine IE, jedoch kein Befund der Hauptkriterien</li> </ul>

**Kohorte Kontrollgruppe: Einschlusskriterien**

In die Kontroll-Gruppe konnten 10 Patienten mit Indikation zur

- Herztransplantation
- Aorta ascendens- Ersatz,

aber **OHNE** Nachweis einer akut infektiösen Endokarditis oder strukturellen Herzklappenerkrankung eingeschlossen werden. Die Kontrollgruppe diente der genauen Differenzierung der makroskopischen, histopathologischen und molekularbiologischen Befunde zwischen akuter/chronischer Herzklappenerkrankung und gesundem Herzklappengewebe. Das Gewebe dieser Kontroll-Patienten wurde mit den gleichen histologischen, mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungsmethoden analysiert wie das Gewebe aus den Kohorten 1 sVHD und 2 aIE.

### *Operationsindikation Kohorte 1, 2, 3*

Die Indikationsstellung zum operativen Eingriff erfolgte bei allen 3 Kohorten im Rahmen der klinischen Routine durch das ärztliche Personal.

### Beschreibung des operativen Prozedere

#### *Aortenklappenersatz: Kohorten sVHD, aIE*

Nach Indikationsstellung und adäquater Aufklärung des Patienten durch das ärztliche Klinikpersonal wurden die Patienten mit akuter oder chronischer Herzklappenerkrankung in Allgemeinanästhesie operiert. Nach sterilem Abwaschen und Abdecken erfolgte in Intubationsnarkose eine mediane- bzw. bei einigen Patienten eine Mini-Sternotomie. Nach Spaltung des Perikards und systemischer Gabe von Heparin zur Vollantikoagulation erfolgte die Kanülierung der Aorta ascendens und des rechten Vorhofs zur Etablierung der extrakorporalen Zirkulation an der Herz-Lungen-Maschine (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Darstellung eines Setups einer Herz-Lungen-Maschine als Methode der Wahl zur extrakorporalen Zirkulation im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe an der Herzchirurgischen Poliklinik Großhadern.

Nach systemischer Kühlung des Patienten auf 34°C erfolgte das Einbringen eines Linksvent über die rechte obere Lungenvene und anschließend eine kontinuierliche Begasung des Operationsfeldes mit CO<sub>2</sub>. Es folgten die Querklemmung der Aorta ascendens und Applikation von kalter Kardioplegie-Lösung nach Bretschneider über eine kombinierte Kardioplegie- und Ventkanüle. Nach vollständigem Herzstillstand erfolgte die quere Inzision der Aorta und anschließend die Inspektion der Aortenklappe. Hochgradig verkalkte Klappen wurden dekalzifiziert und nach mühsamer Präparation exzidiert. Nach Messung des Anulus und Bestimmung der Prothesen-Größe erfolgte die epianuläre Implantation der Klappe. Darauf folgte der Verschluss der Aortotomie und die sorgfältige Entlüftung der Herzhöhlen mit anschließender Freigabe der Koronarperfusion über die Öffnung der Aortenklemme. Nach Defibrillation, Stimulation des Herzens über einen externen Schrittmacher und Einlegen einer substernalen Perikarddrainage wurde mit der Wiedererwärmung und Reperfusion des Patienten, zur langsamen Entwöhnung von der extrakorporalen Zirkulation, begonnen. Nach Dekanülierung des Herzens und Antagonisierung der Heparin-Wirkung durch Protamin erfolgte die Osteosynthese des Sternums über Drahtcerclagen und ein schichtweiser Wundverschluss.

#### *Mitralklappenersatz Kohorten sVHD, aIE*

Dem zuvor genannten Verfahren entsprechend erfolgte in Intubationsnarkose die Eröffnung des Thorax sowie der Anschluss des Patienten an die extrakorporale Zirkulation. Nach Applikation der Kardioplegie-Lösung erfolgte die Eröffnung des linken Vorhofs mit Darstellung des Situs mithilfe eines Vorhofretraktors.

Nach Inspektion der Mitralklappe erfolgte, je nach Befund, die Entfernung endokarditischer Vegetationen sowie die Resektion zerstörter/strukturell veränderter Klappenanteile. Wenn möglich, wurde der Chordae-Apparat der anterolateralen und posteromedialen Papillarmuskelgruppen erhalten. Nach Bestimmung der Prothesen-Größe mithilfe eines Sizers erfolgte die zirkuläre Anlage der Klappennähte. Im Anschluss an die Implantation der Mitralkappen-Prothese wurde der linke Vorhof mit fortlaufender Prolenenahrt verschlossen. Äquivalent zum davor beschriebenen Vorgehen beim Aortenklappenersatz wurde auch beim Ersatz der Mitralklappe, die Aortotomie verschlossen, die Zirkulation wiederhergestellt und nach Defibrillation mit Konversion in einen stabilen Sinusrhythmus die Dekanülierung des Herzens und Heparin-Antagonisierung durchgeführt. Anschließend erfolgte die Osteosynthese des Sternums über Drahtcerclagen und ein schichtweiser Wundverschluss.

Intraoperativ erfolgte sowohl bei Patienten mit struktureller Herzklappenerkrankung als auch bei Patienten mit akut infektiöser Endokarditis eine intravenöse Antibiotikagabe. Bei fehlendem klinischen Hinweis für eine Infektion sowie fehlender präoperativer Antibiotikagabe erfolgte bei den meisten Patienten mit struktureller Herzklappenerkrankung eine Prophylaxe mit Cefuroxim.

Bei Patienten mit akut infektiöser Endokarditis oder Patienten mit präoperativer Antibiotikagabe erfolgte abhängig vom Erregernachweis meist eine mehrfach Kombinations-Antibiotikatherapie unter anderem mit Vancomycin, Gentamycin, Rifampicin / Imipenem.

#### *Aorta ascendens- Ersatz, Herztransplantation: Kohorte Kontrollgruppe*

Die Explantation des Gewebes der Patienten aus der Kontrollgruppe (Kohorte 3) erfolgte im Universitätsklinikum Leipzig gemäß dem eigenen klinikinternen chirurgischen Standard. Alle Patienten aus den 3 Kohorten wurden postoperativ intubiert und beatmet und meist unter moderater Therapie mit Katecholaminen, in stabilen Kreislaufverhältnissen, auf die Intensivstation verlegt.

Neben isolierten Operationen an der Aorten- oder Mitralklappe wurden auch Kombinationseingriffe aus operativem Klappenersatz und koronarer Bypass-Operation sowie kombinierte Eingriffe an 2 oder mehr Klappen durchgeführt.

#### Intraoperative makroskopische Klassifizierung des Verkalkungsgrades

Intraoperativ erfolgte die Inspektion der strukturell veränderten Klappe und die individuelle Graduierung des Verkalkungsgrades durch den Operateur. Dabei konnten die Klappen anhand der folgenden drei Grade differenziert werden:

- Massiv verkalkt
- Deutlich verkalkt
- Leicht verkalkt

#### Erfassung intraoperativer Daten

Folgende im OP-Protokoll vermerkten Daten konnten über die klinikinterne elektronische Datenbank (SAP) aufgerufen und dokumentiert werden:

OP-Dauer, HLM-Dauer, Ischämiezeit, Sternotomie, intraoperativ verabreichtes Antibiotikum.

## Erfassung der Verlaufsdaten zur Bestimmung der postoperativen Morbidität und Mortalität

Postoperativ wurden alle Patienten auf die herzchirurgische Intensivstation verlegt, dort überwacht und nach klinikinternen Standards weiterbehandelt. Diese Standards beinhalten eine engmaschige postoperative Überwachung mit regelmäßigen Kontrollen der klinischen und laborchemischen Entzündungszeichen (Leukozyten, CRP, IL-6) und haben das Ziel eines Fast-Tracks, d.h. eine schnelle Stabilisierung, Mobilisation des Patienten mit rascher Verlegung auf Normalstation. Das auf ITS tätige ärztliche und pflegerische Personal dokumentierte routinemäßig bei jedem Patienten postoperative Komplikationen wie dialysepflichtige Nierenfunktionseinschränkung, Sepsis, neurologische Dysfunktion, Reintervention, Tracheotomie, Herzrhythmusstörungen und respiratorische Insuffizienz. Diese Parameter sowie die Dokumentation der Beatmungsdauer wurden automatisiert über die Software Q-Care ICU (HIM GmbH 2016) erfasst. Die Beatmungsdauer entsprach dabei der Dauer einer invasiven endotrachealen Beatmung und wurde in Stunden dokumentiert. Für die Behandlung der dialysepflichtigen Niereninsuffizienz standen neben einer kontinuierlichen Hämofiltration auch eine intermittierende Dialyse zur Verfügung, sodass bei der Dokumentation der Dialysedauer die Dauer der Dialysepflicht des Patienten und nicht die Behandlungsdauer am Dialysegerät erfasst wurde.

Anschließend an den Intensivaufenthalt wurden die Daten (Beatmungsdauer, dialysepflichtige Niereninsuffizienz, respiratorische Insuffizienz, neurologische Dysfunktion, Katecholaminbedarf bei Verlegung auf ITS, Intensiv-Liegedauer) über Mitarbeiter der Qualitätssicherung in die Dokumentationssoftware KardioSoft (itrox GmbH 2018) übertragen, über die sowohl anamnestische Daten, Operationsdaten, Daten während des Intensivaufenthalts und ev. Follow-up Daten gebündelt aufgerufen werden konnten.

Die Komplettierung der prä-, intra- und postoperativen Daten erfolgte anhand schriftlicher und elektronischer Patientenakten und klinikinternen Dokumentationssystemen.

## Erfassung klinisch-anamnestischer Daten

Über die Durchsicht von patientenbezogenen Entlass- oder Überweisungsbriefen konnten folgenden klinische Parameter zu jedem eingeschlossenen Patienten erfasst und im Datenverarbeitungsprogramm Excel 2010 dokumentiert werden:

Größe, Gewicht, Arterieller Hypertonus, Hyperlipidämie, NYHA-Stadium, vorbestehende Herzrhythmusstörungen, Ejektionsfraktion, Diabetes mellitus, pAVK, chronische Lungenerkrankungen, Niereninsuffizienz, Neurologische Dysfunktion, Pulmonaler Hypertonus, Raucheranamnese, frühere Herzoperationen (Klappe, Bypass), Antibiotikatherapie, klinische Hinweise für eine Infektion.

#### Erfassung der Echokardiographie-Befunde zur Klassifikation des Vitiums

Präoperative echokardiographische Befunde, dokumentiert im Intranet des Klinikums (LAMP) oder externen Arztbriefen, wurden zur Charakterisierung des Klappenvitiums verwendet. So konnte zwischen isolierten und kombinierten Vitien als auch Mehrfach-Klappen-Vitien unterschieden werden. So versteht man unter einem isolierten Vitium eine Stenose oder Insuffizienz an einer Herzklappe. Ein kombiniertes Vitium beschreibt eine Kombination aus Stenose und Insuffizienz an derselben Herzklappe. In die Gruppe der Mehrfach-Klappen-Vitien fallen jene Patienten mit pathologischen Veränderungen an mehr als einer Herzklappe.

#### Risikobewertung anhand von SCORE-Systemen

Anhand von präoperativen Daten wurde über die Verwendung von 3 Scores (additiver/logistischer EuroSCORE, EuroSCORE II, STS-Score) für jeden Patienten ein individuelles Mortalitätsrisiko sowie das Risiko für postoperative Komplikationen berechnet.

Solche Risikoscores zur Berechnung der postoperativen Mortalität werden in der klinischen Praxis zur ärztlichen Indikationsstellung und Abschätzung des individuellen Risikos des Patienten vor einem herzchirurgischen Eingriff herangezogen [115].

Beim EuroSCORE handelt es sich um ein online-verfügbares Risikomodell zur Berechnung eines individuellen Mortalitäts- und Komplikationsrisikos nach einer herzchirurgischen Operation, welches insgesamt 17 kardiologische und operationsbezogene Parameter benötigt, um das Risiko zu berechnen. Der EuroSCORE unterscheidet zwei verschiedene Score-Systeme: das additive Modell, das nach einfachen arithmetischen Mitteln kalkuliert wird und das logistische Modell, welches umfassender und deutlich komplexer aufgebaut ist [116]. Da mehrere Studien von einer Überschätzung der postoperativen Mortalität mittels des EURO Score I berichten [117], wurde der Euro SCORE II zur Verbesserung der Aussagekraft des berechneten Mortalitätsrisikos entwickelt.

Der STS-Score wurde 2007 von der Society of Thoracic Surgeons entwickelt und erfordert im Gegensatz zum EuroSCORE detailliertere Informationen über die Patienten zur Berechnung des Mortalitätsrisikos. So umfasst dieser neben der Mortalitätsberechnung auch die Berechnung des Risikos für Morbidität, 30-Tage Mortalität, neurologische Komplikationen, Wundinfektionen, Reoperationsrate, verlängerte invasive Beatmung und Niereninsuffizienz [118].

Neben allgemeinen patientenbezogenen Daten, wie Alter, Geschlecht, Nierenfunktion, Voroperationen, chronische Lungenerkrankung, Diabetes, NYHA-Stadium, Pulmonaler Hypertonus, kardiale Voroperationen, Art des herzchirurgischen Eingriffs, werden beim STS-Score auch detaillierte Parameter wie präoperativer Kreatininwert, Grad der Stenosierung bei bekannter KHK, Herzrhythmusstörungen oder der präoperative Bedarf an Katecholaminen für die Berechnung des Scores benötigt.

Je nach berechnetem Gesamtpunktwert (Prozentwert) können die Patienten einer der folgenden Risikogruppen zugeordnet werden:

**Tabelle 9:** Definition der Risikogruppen des EuroSCORE I nach [119]

Risiko	EuroSCORE I
Geringes Risiko	0-2 (%) Punkte
Mittleres Risiko	3-5 (%) Punkte
Hohes Risiko	>6 (%) Punkte

**Tabelle 10:** Definition der Risikogruppen nach EuroSCORE II nach [120]

Risiko	EuroSCORE II
Geringes Risiko	bis 4%
Mittleres Risiko	4% - 9%
Hohes Risiko	>9%

**Tabelle 11:** Definition der Risikogruppen nach STS-Score nach [121]

<b>Risiko</b>	<b>STS-Score</b>
Mittleres Risiko	<8%
Hohes Risiko	8% - 14,9%
Extrem hohes Risiko	>15%

#### **4.2.3 Biomaterial Handling und Prozessierung**

Nach chirurgischer Explantation der Herzklappe wurde das Gewebes standardmäßig für die weitere mikrobiologische und pathologische Analyse aliquotiert und steril bis zur jeweiligen Untersuchung asserviert. Dabei wurde neben den Gewebeproben für das Pathologische Institut der LMU sowie dem Max-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU eine weitere Gewebeprobe für die eigene wissenschaftliche Arbeit gesammelt.

#### **4.2.4 Histopathologische Untersuchung**

Abhängig von der individuellen Entscheidung des zuständigen Operators erfolgte bei einem Teil der chronisch strukturell veränderten Herzklappen eine pathologische Untersuchung des explantierten Herzklappengewebes am Pathologischen Institut der LMU. Dort wurde das Gewebe, nach makroskopischer Beurteilung durch einen Pathologen, in 4% neutral gepuffertem Formalin ausreichend fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend in dünne Präparate geschnitten. Die Schnittpräparate wurden standardmäßig mit folgenden 3 Färbungen angefärbt und anschließend lichtmikroskopisch untersucht: HE-, Elastica-van-Gieson-, PAS-Färbung.

Als Bestandteil der modifizierten Duke-Kriterien, als auch der historischen von Reyn-Kriterien, spielt die histopathologische Untersuchung des Herzklappengewebes eine wesentliche Rolle in der Diagnostik der akut infektiösen Endokarditis [122]. In den beiden Kriterien als „direkte Hinweise für eine akut infektiöse Endokarditis“ bezeichnet, wird die Diagnose der aIE in der klinischen Pathologie histopathologisch anhand folgender Kriterien gestellt:

- Nachweis von Vegetationen, bestehend aus Thrombozyten, Fibrin und Entzündungsinfiltrat
- Direkter mikroskopischer Erregernachweis
- Abszess-Nachweis
- Akutes Entzündungsinfiltrat mit polymorphonukleären Leukozyten (PMLs) [123]

Das Fehlen dieser vorher genannten Kriterien und der histopathologische Nachweis von Kalzifikation und Fibrose und chronischen Entzündungszellen, wie Histozyten und Lymphozyten, spricht eher für ein chronisches Geschehen im Rahmen struktureller Herzklappenerkrankungen [124].

Für die eigene wissenschaftliche Arbeit erfolgte eine gesonderte histopathologische Untersuchung in einem Speziallabor in Leipzig. Dafür wurde das Herzklappengewebe in 4% Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Über einen automatischen Gewebeprozessor (*TP1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Deutschland*) konnte das Gewebe entwässert werden. Die Gewebeblöcke wurden bis zur weiteren Analyse in sterilen Plastikassetten gelagert.

Zur differenzierten Visualisierung von unterschiedlichen Gewebestrukturen wurden aus den fixierten Gewebeblöcken 10µm große Schnitte erstellt und anschließend einer Crossman-Trichrom-Färbung, einer Von-Kossa-Färbung und einer Van-Gieson-Färbung unterzogen. Die gefärbten Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht. In der Crossman-Färbung, einer Trichrom-Färbung, werden die Zellkerne schwarz-braun, das Bindegewebe blau-grün und Muskelzellen mit rot-violetter Zytoplasma dargestellt. Die Van-Gieson-Färbung stellt im Wesentlichen Kollagenfasern und Muskelzellen dar (Kerne: schwarz-braun, Zytoplasma: hellbraun, elastische Fasern und Muskel: gelb, Kollagenfasern: rot) und die Von-Kossa-Färbung wird für die spezielle Darstellung von Kalzifikationen verwendet.

Als histologische Positivkontrollen wurden *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ) aus Herzklappengewebe von aIE isoliert und wie nachfolgend beschrieben kultiviert. Die Bakterien wurden von der Kulturplatte auf Glasobjektträger übertragen, anschließend luftgetrocknet und mit 4% Formaldehyd fixiert.

Für den unspezifischen Nachweis von Bakterien im Gewebe chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen wurden die Nukleinsäure-Farbstoffe Hexidiumiodid (1: 500; *Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland*) und SYTO 13 (1: 200; *Molecular Probes, Life Technologies GmbH*) verwendet. Bei dem Nukleinsäurefarbstoff Hexidiumiodid handelt es sich um einen Farbstoff, der in der Lage ist in Säugetierzellen einzudringen und selektiv fast alle Gram-positiven Bakterien in Gegenwart Gram-negativer Bakterien zu färben. Hexidiumiodid zeigt bei der Bindung von DNA Anregungs-/Emissionsmaxima von ~ 518/600 nm. SYTO 13 ist ein grün fluoreszierender Nukleinsäurefarbstoff (Anregungs-/Emissionsmaxima von ~ 488/509), der die Nukleinsäure sowohl von Säugetierzellen als auch der meisten Bakterien anfärbt.

Nach der Antigendemaskierung über die hitzeinduzierte Epitop-Rückgewinnung in geeigneter Lösung (*Rückgewinnungslösung pH 9,0, Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA*) wurden die Gewebeschnitte bei 4 °C mit primären Antikörpern über Nacht inkubiert. Es wurden folgende primäre Antikörper verwendet: Anti-Staphylococcus aureus-Antikörper 704 (1:100; *ab37644, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich*), CD14-Antikörper (1:200; *NBP1-40683, Novus Biologicals Europe, Abingdon, Vereinigtes Königreich*) für den Nachweis infiltrierter Makrophagen und CEACAM-6/CD66c-Antikörper (1:100; *NB100-65005, Novus Biologicals Europe*) für den Nachweis von neutrophilen Granulozyten.

Unter Verwendung von Sekundärantikörpern wurde außerdem eine indirekte Immunofluoreszenz durchgeführt, die mit Alexa Fluor 488 (1:500; *Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA*) und Alexa Fluor 647 (1:500; *Dianova, Hamburg, Deutschland*) konjugiert waren. Die Zellkerne im Gewebe wurden mit Hexidiumiodid gefärbt (1:500; *Molecular Probes, Life Technologies GmbH*).

Die Analyse des Gewebes erfolgte mit einem konfokalen Zeiss LSM-5 Pascal-Laser-Scanning-Mikroskop (*Carl Zeiss, Jena, Deutschland*).

#### **4.2.5 Mikrobiologische Analyse**

Ein Teil des explantierten Herzklappengewebes wurde postoperativ im Rahmen der klinikinternen Routinediagnostik zur mikrobiologischen Untersuchung an das Max-Planck-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU geschickt. Dort erfolgt die Inkubation des Gewebes in folgenden Kulturmedien: Columbia Agar, Kochblutagar, Mac Conkey Agar und Sabouraud Agar. Außerdem erfolgt eine 14-tägige

Bebrütung in Trypticase Soyabouillon und Thioglyconat Bouillon. Zur weiteren Identifizierung möglicher bakterieller Erreger im Herzklappengewebe wurde eine Pan-Bakterien-PCR durchgeführt. Die Identifikation der Erreger erfolgte über eine MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Im Rahmen der eigenen wissenschaftlichen Arbeit wurden neben der Routinediagnostik weitere mikrobiologische Untersuchungen des explantierten Gewebes im Labor durchgeführt. Die asservierten Proben aus Herzklappengewebe wurden in sterile Röhren mit 6 ml Hirn-Herz-Infusions-Bouillon (BHI), einem nährstoffreichem Flüssigmedium zur Kultivierung von anspruchsvollen Organismen, ergänzt durch 5% Fildes-Extrakt (*beide OXOID Ltd., Hampshire, England*), gefüllt und anschließend in ein Ultraschallbad gegeben (*BactoSonic®*, *BANDELIN electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland*). Mit dem Ziel Bakterien, die sich in Biofilmen auf der Gewebeoberfläche befinden, freizulegen und in einen planktonischen Zustand, d.h. in eine freie Suspension, zu überführen, wurden die Proben über 15 Minuten mit einer Ultraschallfrequenz von 35 kHz behandelt.

Anschließend wurden die Proben in einer CO<sub>2</sub>-reichen Atmosphäre (5%) bei einer Temperatur von 37 °C für 14 Tage inkubiert. Eine Trübung der Proben, als Beweis für bakterielles Wachstum, wurde an den Tagen 4, 7 und 14 der Inkubation beurteilt.

Die Proben mit vermutetem Wachstum wurden auf 5% Schafblut-enthaltendem Columbia-Agar (*Roth; Karlsruhe, Deutschland*), Columbia-Agar ergänzt mit gekochtem Blut und IsoVitalex (*BD BBL, Le Pont de Claix, Frankreich*), Endo-Agar (*Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*), Aesculin-Agar (*OXOID*), Sabouraud-2%-Glucose-Agarplatten (*Sifin diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland*) und anaerobe Medien (*ergänzt mit Brucella-Agar; BD BBL*) verteilt und für 4 Tage in einer kapnophilen (5% CO<sub>2</sub>) und anaeroben Atmosphäre (*GenBag, BioMérieux, Marcy L'Étoile, Frankreich*) bei 37°C inkubiert.

Blutagarplatten wurden mit *Staphylococcus aureus* H1 kreuzgestreift, um auch anspruchsvollen Bakterien, die sich nur in Anwesenheit einer zweiten Bakterienart vermehren (Satellitenphänomen), das Wachstum zu ermöglichen.

Das Wachstum wurde täglich bewertet und nach 14 Tagen Inkubation wurden alle Proben subkultiviert, unabhängig davon, ob sie Anzeichen für vorheriges Wachstum zeigten oder nicht.

Wenn eine Subkultur bakterielles Wachstum zeigte, wurde durch Massenanalyse über VITEK® MALDI-ToF MS (*BioMérieux Inc., Durham, NC, USA*) die Identifizierung der Erreger durchgeführt. Eine antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung wurde mittels der

Bouillon-Mikrodilutionsmethode oder Epsilometer-Tests (*Etest AB Biodisk, Solna, Schweden*) gemäß den EUCAST-Richtlinien durchgeführt. Zur Langzeitlagerung wurde für jeden Stamm ein mikrobieller Kryokonservierungsstamm mit Cryobank TM (*Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland*) erstellt.

Durchschnittlich wurden von jedem eingeschlossenen Patienten zwei Sätze von Blutproben während der Operation von der Herz-Lungen-Maschine, dem zentralen Venenkatheter oder peripherer Venenpunktion gesammelt.

Aus den gesammelten Blutproben wurden jeweils 10 ml Blut in aerobe und anaerobe Blutkulturflaschen (*BacT / ALERT FA / FN, BioMérieux Inc., Durham, NC, USA*) inokuliert und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Blutkulturflaschen wurden im Labor in ein automatisches kontinuierliches Überwachungssystem (*BacT / ALERT 3D*) gegeben und bei 36 °C für einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert.

Wenn die Algorithmen in einer Flasche bakterielles Wachstum anzeigten, wurde eine Subkultur auf festem Medium, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Subkulturen wurden erneut für 4 Tage bei einer Temperatur von 36°C in einer kapnophilen und anaeroben Atmosphäre inkubiert. Die Identifizierung und antimikrobielle Empfindlichkeitstestung wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Trat auf festen Medien kein bakterielles Wachstum auf, wurden die Blutkulturflaschen weiter bei 37 °C inkubiert und die manuelle Subkultur wurde zweimal während der 21-tägigen Inkubation wiederholt.

#### **4.2.6 Molekularbiologische Diagnostik**

##### **Protokoll der TaqMan-PCR**

Nach Zelllyse des Herzklappengewebes (25mg) mit 20 mg/ml Lysozym in einem geeigneten Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton) wurde die bakterielle DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert.

Als positive Kontrollschablonen für die qPCR wurde gereinigte DNA aus Monokulturen verwendet. Die Konzentration von spezifischen DNA-Verdünnungen wurde gegen den Cp-Wert (Kreuzungspunkt) aufgetragen, um eine Standardkurve zu erzeugen, die für die absolute Quantifizierung verwendet wurde.

Insgesamt bestanden 25µl der PCR-Reaktionsmischung jeweils aus 2,5µl DNA als Matrize, 6,0 µl Wasser, 12,5 µl Master Mix (Eurogentec, Seraing, Belgien) und 1,5 µl

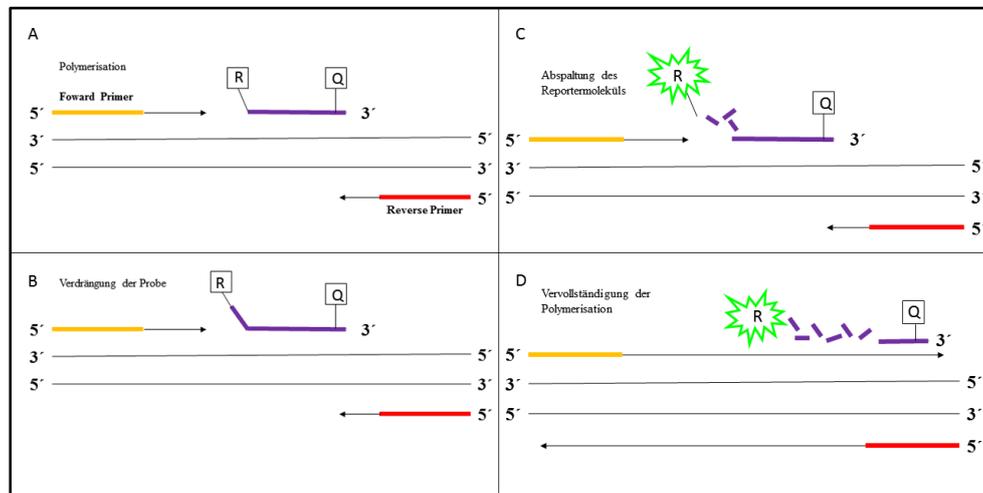
der Primer F und R sowie 1,0 µl des Primer S. Für die Amplifikation der 8 Keime wurden jeweils ein Primer-Paar sowie eine spezifische TaqMan-Sonde verwendet: *Staphylococcus aureus* (**Primer:** saur-F: CAA AGC ATC CTA AAA AAG GTG TAG AGA (27), saur-R: TTC AAT TTT CTT TGC ATT TTC TAC CA (26), **Sonde:** saur-S: [FAM] TTT TCG TAA ATG CAC TTG CTT CAG GAC CA [BHQ1] (29,)) *Propionibacterium acnes* (**Primer:** GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA, TTCCGACG CGATCAACCA; **Sonde:** FAM-AGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG-TAMRA), *Enterococcus faecalis* (**Primer:** GACAGGAAAGAACTAGGAGGAC , AAACAGA CACATCGTGCT ; **Sonde:** FAM-CACTTCTGCCGCCATACAACAA-TAMRA), *Enterococcus faecium* (**Primer:** CGTAGCATTCTATGATTATGAAGCC,CATCGTGT AAGCTAACTTCG; **Sonde:** FAM-CAGATTCCAGCCGAAGTGCC-TAMRA), *Streptococcus pyogenes* (**Primer:** GGRACACGTACCCAAAATGTAGGA, TCTTGA GCTCTTTGTTTCGGTRTAG **Sonde:** FAM-CGTGACCAAAAAGGCGGCATGC-TAMRA) und *Clostridium difficile* (**Primer:** GAA GCT ACT AAG GGT ACA AA, GGT CTA TTC CTA CTT CTA ATG C; **Sonde:** FAM-ATA AGA GGT GAA ACT TCT CCT GTA AAT GCT CC-TAMRA).

Alle Primer wurden in einer Konzentration von 300nm sowie alle Sonden in einer Konzentration von 200nm eingesetzt. Die Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und die PCR-Amplifikation wurde unter Verwendung eines Roche Light Cyclers 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit dem SYBR grünen Fluoreszenzfarbstoff (QuantiNova SYBR Green PCR Kit, Qiagen) durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt.

Das PCR-Protokoll bestand bei allen gemessenen Keimen anfänglich aus zwei 10-minütigen Zyklen mit einer Temperatur von 50°C und 95°C. Anschließend folgten 40 Zyklen Denaturierung bei 95° C für 15s, gefolgt von einer Kombination aus Primerhybridisierung und Extension für 60s bei 60 ° C. Bei Amplifikation der beiden Keime *Enterococcus faecalis* und *faecium* erfolgte die Primerhybridisierung bei 52°C für 15s, gefolgt von der Extension bei 72°C für 60s. Die seriellen Verdünnungsstandards, die negativen Kontrollen und die Proben wurden gleichzeitig doppelt gemessen.

Am Ende der Amplifikation wurde die SYBR-Grün-Fluoreszenz kontinuierlich während der Schmelzkurve gemessen. Dabei wurde die Probe bei kontinuierlicher Fluoreszenzüberwachung mit einer Steigerung von 2,2 ° C/s von anfänglichen 65°C auf 95 °C erhitzt. Somit konnte eine Schmelzkurve als Maß für die Spezifität der PCR-Reaktion generiert werden. Wasser wurde als negative Kontrolle in der PCR-Reaktion

verwendet. Wie bei der 16s rDNA Amplifikation wurde DNA aus Wasser extrahiert, um die Abwesenheit von kontaminierender bakterieller DNA in Wasser, Puffer, Ausrüstung und Reagenzien sicherzustellen.



**Abbildung 9:** Die hochspezifische, quantitative TaqMan-PCR benötigt neben einem spezifischen Primer-Paar auch spezielle fluorogene Sonden, nämlich eine Reporter-Sonde am 5'-Ende und eine Quencher-Sonde am 3'-Ende. Durch die räumliche Nähe dieser beiden Sonden wird die Fluoreszenz unterdrückt (A). Erst die DNA-Polymerase verdrängt die Sonde, sodass Reporter und Quencher getrennt werden, wodurch die Fluoreszenz detektiert werden kann (C). Die Intensitätszunahme ist proportional zur Anzahl der PCR-Produkte (D). Die Grafik wurde in Anlehnung an Figure 3 aus einer wissenschaftlichen Arbeit von Wang et al., erstellt. [125].

#### 4.2.7 Statistik

Für den phänotypischen Vergleich der Kohorten wurde in Microsoft Excel 2010, zur Bestimmung der p-Werte, für metrische Variablen der *Student's T-Test* sowie für ordinale Variablen *Fishers exakter Test* herangezogen und berechnet. Die Korrelationsanalysen wurden mithilfe der Rangordnungskorrelation nach Spearman durchgeführt.

Die Darstellung der 30-Tage Mortalitätsrate erfolgte über Kaplan-Meier-Kurven sowie der Vergleich zweier Überlebenskurven über den Log-Rank-Test, deren Berechnung jeweils über das Statistikprogramm GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) erfolgte.

Alle Grafiken wurden ebenfalls mit dem Programm GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) erstellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Phänotypisierung des Patientenkollektivs

In der vorliegenden Untersuchung sind drei pathophysiologisch unterschiedliche Kohorten, die alle einer herzchirurgischen Klappenintervention unterlagen, analysiert worden. Als Kontrollgruppe fungiert eine sowohl im Alter als auch im Geschlecht inhomogene Patientengruppe, die entweder einer Herztransplantation oder Aorta ascendens-Ersatz-Operation unterzogen wurde und keine Hinweise auf eine pathologische Herzklappenfunktion zeigte. Diese Klappengewebeproben wurden gegebenenmaßen als gesund eingestuft und gestatten somit die Definition als Bezugspunkt zur Abweichung vom gesunden Gewebe. Diese Kohorte wurde denselben histopathologischen, molekularbiologischen und mikrobiologischen Untersuchungen unterzogen wie die beiden Kohorten mit akuter bzw. chronischer Herzklappenerkrankung und fungiert somit als negative Kontroll-Gruppe für die angewandten Untersuchungen. Die Grafiken und Phänotyp-Tabellen beziehen sich lediglich auf die eigentliche Kohorte von Interesse (Kohorte 1 sVHD), jeweils verglichen mit der Gruppe der akut infektiösen Endokarditis (Kohorte 2 aIE).

Die eigentliche Kohorte von Interesse ist die nachfolgend dargestellte, bestehend aus 100 Patienten mit einer präoperativ gesicherten strukturellen Herzklappenerkrankung mit divergentem klinischen Ausprägungsgrad.

Um eine Abgrenzung zwischen einem möglichen chronischen Infektionsstatus der sVHD-Klappen zu den histomorphologischen, molekularbiologischen Merkmalen einer akut infektiösen Endokarditis realisieren zu können, wählten wir eine Kohorte von 23 Patienten, die mindestens einen mikrobiologisch positiven Befund mit bakteriellen Erregern einer Herzklappe aufwiesen. Im Wesentlichen dient diese Gruppe der Abschätzung des Ausprägungsgrades der TaqMan-PCR bei akuter mikrobiologisch nachgewiesener Infektion gegenüber einer möglichen chronischen Infektionslage.

## 5.1.1 Anamnestische Parameter

**Tabelle 12:** Phänotypisierung der Kohorten mit chronischer bzw. akuter Herzklappenerkrankung: Der Vergleich erfolgte über die Berechnung des Student's t-Test für metrische Variablen sowie über Fisher's exaktem Test für ordinale Variablen. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wird als statistisch signifikant angesehen.

Phänotyp	Strukturelles Aortenklappenventilium n=100	Akut infektiöse Endokarditis der Aortenklappe n=23	p-Wert signifikant <0,05
Alter (Jahre)	67,36 ± 1,14	68,9 ± 1,95	0,7931
<b>Geschlecht n (%)</b>			
Männlich	70 (70,00)	15 (65,2)	0,9999
Weiblich	30 (30,00)	8 (34,8)	0,9999
Gewicht (kg)	83,25 ± 1,43	80,04 ± 14,96	0,7272
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,07 ± 0,43	26,95 ± 4,14	0,5269
BSA (m <sup>2</sup> )	2,00 ± 0,02	1,93 ± 0,21	0,3501
<b>LVEF n (%)</b>			
> 55%	81 (81,00)	11 (47,80)	0,0001*
45-54%	12 (12,00)	10 (43,48)	0,0104*
30-44%	7 (7,00)	1 (4,35)	0,9999
NYHA I-II n (%)	43 (43,00)	13 (56,5)	0,8073
NYHA III-IV n (%)	51 (51,00)	10 (43,48)	0,8073
Kardiogener Schock n (%)	0 (0,00)	3 (13,04)	0,0145*
Kreatinin	107,97 ± 6,57	81,44 ± 28,82	0,0145*
Leukozyten	7,37 ± 0,23	15,75 ± 9,71	0,0009*
CRP	10,54 ± 2,77	73,02 ± 86,08	0,0043*
IL-6	15,29 ± 7,40	23,76 ± 31,36	0,4087
Frühere Herz-OP	21 (21,00)	14 (60,9)	0,0041*
<b>Mortalitätsrisiko (%)</b>			
EuroSCORE II	5,22 ± 1,06	32,99 ± 24,34	0,0001*
EuroSCORE I	6,79 ± 2,67	14,51 ± 4,57	0,0001*
STS Score	2,02 ± 0,17	15,41 ± 14,68	0,0002*
<b>Operationsdringlichkeit</b>			
Notfall	0 (0,00)	10 (43,48)	0,0001*
Dringlich	0 (0,00)	8 (35,78)	0,0001*
Elektiv	100 (100,00)	2 (8,70)	0,0001*

### Alter und Geschlecht

Insgesamt konnten unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien 100 Patienten in die Kohorte 1 eingeschlossen werden. Dabei setzte sich die Kohorte aus 30% Frauen (n=30) und 70% Männern (n=70) zusammen. Zum Zeitpunkt der Operation lag das mittlere Lebensalter der Patienten bei 67 Jahren, bei einem Höchstalter von 75 Jahren und einem Mindestalter von 55 Jahren.

In die Kohorte 2 (aIE) konnten 15 Männer und 8 Frauen mit einem mittleren Lebensalter von 68 Jahren eingeschlossen werden.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 10 Patienten im Alter von 26-67 Jahren zusammen.

### Körpergewicht, Körpergröße und BMI

Das mittlere Körpergewicht der Patienten aus Kohorte 1 lag bei  $83,25 \pm 1,43$  kg und die mittlere Körpergröße bei  $172,20 \pm 8,61$  cm. Daraus ergab sich ein mittlerer Body-Mass-Index von  $28,07 \pm 0,43$  kg/m<sup>2</sup>. Ein Body-Mass-Index von  $25$  kg/m<sup>2</sup> –  $29$ kg/m<sup>2</sup> gilt laut Definition bereits als Präadipositas [126]. Weder Körpergröße und Gewicht noch der BMI unterschieden sich in den beiden Kohorten signifikant voneinander.

### Klinische Symptomatik und Herzinsuffizienz

Präoperativ zeigten 94% der Patienten mit struktureller Herzklappenerkrankung Zeichen einer Herzinsuffizienz und klagten über Ruhe- oder Belastungsdyspnoe sowie über eine Einschränkung der allgemeinen Leistungsfähigkeit. Bei 51% der Patienten entsprach die Symptomatik einem NYHA-Stadium 3 oder 4 sowie in 43% der Fälle einem Stadium 1 oder 2. Die Rate der Herzinsuffizienz in der Kohorte mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung unterschied sich nicht signifikant von der Kohorte der akut infektiösen Endokarditis.

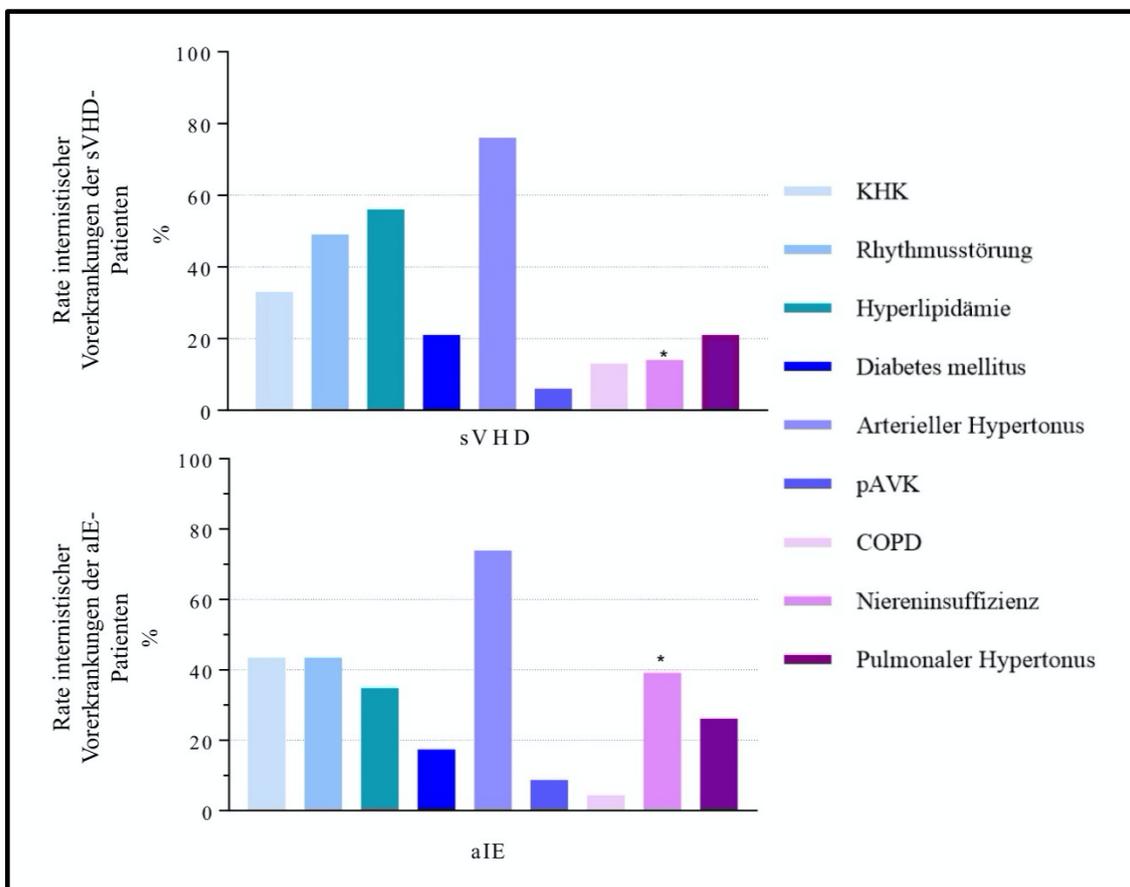
### Komorbiditäten

Von insgesamt 100 Patienten litt der Großteil der Patienten (76%) an arteriellem Hypertonus, während ein kleinerer Teil der Patienten (21%) einen Diabetes mellitus (insulinpflichtig, nicht-insulinpflichtig) aufwies. Daneben zeigten 56% der Patienten eine Hyperlipidämie im Serum. Eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung konnte bei 13% der Patienten erfasst werden sowie in 21% der Fälle ein pulmonale Hypertonie.

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie eine koronare Herzkrankheit und peripher arterielle Verschlusskrankheit, konnten bei 33% (3-Gefäß-KHK: 12%, 2-Gefäß-KHK: 7%, 1-Gefäß-KHK: 14%), bzw. 6% (pAVK) der Patienten erfasst werden.

Knapp die Hälfte der Patienten (51%) befand sich zum Zeitpunkt der Operation im Sinusrhythmus, während 49% der Patienten eine Herzrhythmusstörung aufwies. Außerdem zeigten 14% der Patienten präoperativ eine nicht-dialysepflichtige Niereninsuffizienz.

Die Kohorte 2, bestehend aus den Patienten mit akut infektiöser Endokarditis, wiesen eine ähnliche Rate an Komorbiditäten auf. Lediglich in der Häufigkeit einer präoperativ bestehenden Niereninsuffizienz unterschieden sich die beiden Kohorten signifikant voneinander ( $p= 0,0035$ ), d.h. die Patienten mit akuter Infektion litten präoperativ häufiger an einer Niereninsuffizienz als die Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung.



**Abbildung 10:** Präoperativer Status der sVHD- und aIE-Patienten. Dargestellt wird der prozentuale Anteil der Patienten, die vor dem operativen Klappenersatz an den oben genannten internistischen Vorerkrankung litten. Lediglich in der Rate der präoperativ vorhandenen Niereninsuffizienz unterschieden sich die beiden Kohorten signifikant voneinander ( $p \leq 0,05$ ). Alle anderen Komorbiditäten zeigten eine ähnliche Verteilung in der sVHD- und aIE-Kohorte.

### Frühere herzchirurgische/kardiologische Eingriffe

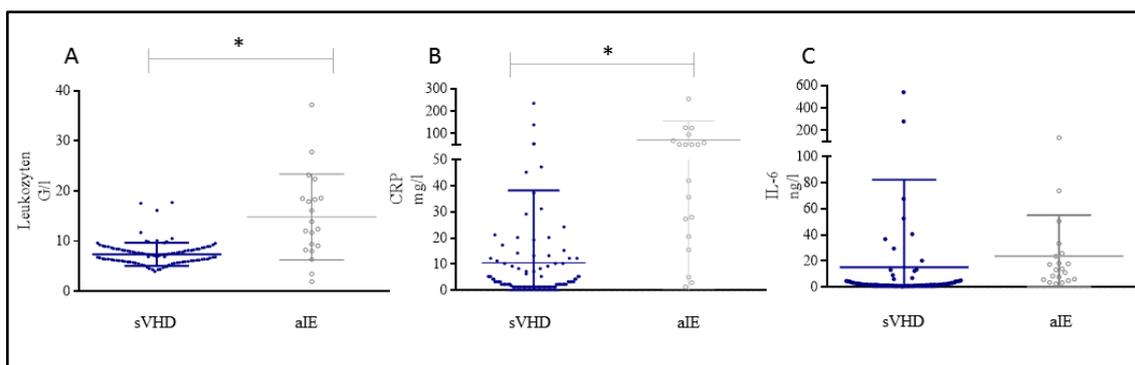
Von den insgesamt 100 Patienten mussten sich 20% bereits einmal einem herzchirurgischen Eingriff bzw. einer kardiologischen Intervention unterziehen. So wurde bei 11 (11%) sVHD-Patienten eine interventionelle Stent-Implantation durchgeführt, 3% der Patienten wurde ein Schrittmacher implantiert und 6 Patienten wurden am offenen Herzen operiert (3 Mitralklappenrekonstruktionen, 2x Aortenklappenersatz, 1 Aorta ascendens- Ersatz).

### 5.1.2 Klinische Zeichen und Parameter der Entzündung

Der Großteil der Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung zeigte klinisch keine Zeichen einer akuten Infektion. Insgesamt konnte zum Zeitpunkt der Operation bei 4 Patienten mit sVHD eine Temperatur von  $>38^{\circ}\text{C}$  gemessen werden. Im Gegensatz dazu wiesen 61% der Patienten mit akut infektiöser Endokarditis eine Körpertemperatur von  $>38^{\circ}\text{C}$ , als klinisches Zeichen einer akuten Infektion, auf. Daneben zeigten 9% der Patienten mit aIE präoperativ Endokarditis-typisch vaskuläre Befunde wie arterielle Embolien, mykotische Aneurysmen, septische pulmonale Embolien, intrakranielle oder konjunktivale Hämorrhagien, sowie Janeway-Läsionen. Die Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung zeigten keine dieser Endokarditis-typischen Befunde.

Obwohl bei Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung, abgesehen vom Fieber, klinisch keine weiteren Hinweise für eine Infektion gefunden werden konnten, waren die laborchemisch gemessenen Entzündungsparameter (CRP, IL-6, Leukozyten) bei einem Teil der Patienten präoperativ deutlich erhöht. Im Mittel konnten folgende Werte gemessen werden: CRP  $10,54 \pm 2,77$  mg/l, IL-6  $15,29 \pm 7,4$  ng/l, Leukozyten  $7,37 \pm 0,23$  G/l.

Die Patienten mit akuter Infektion zeigten im Vergleich zu jenen mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung signifikant höhere ( $p=0,001$ ;  $p=0,004$ ) Leukozytenzahlen und CRP-Konzentrationen. Lediglich die IL-6 Konzentration unterschied sich in den beiden Gruppen nicht signifikant voneinander ( $p=0,409$ ). In der nachfolgenden Abbildung wird dieser Konzentrationsunterschied graphisch dargestellt.



**Abbildung 11:** Präoperativ laborchemisch gemessene Entzündungsparameter der beiden Kohorten (1=sVHD, 2= aIE) A: Leukozyten-Zahl im Serum G/l, B: CRP-Konzentration im Serum in mg/l C: IL-6 Konzentration im Serum in ng/l; Statistisch signifikanter Unterschied der CRP-Konzentration und Leukozytenzahl.

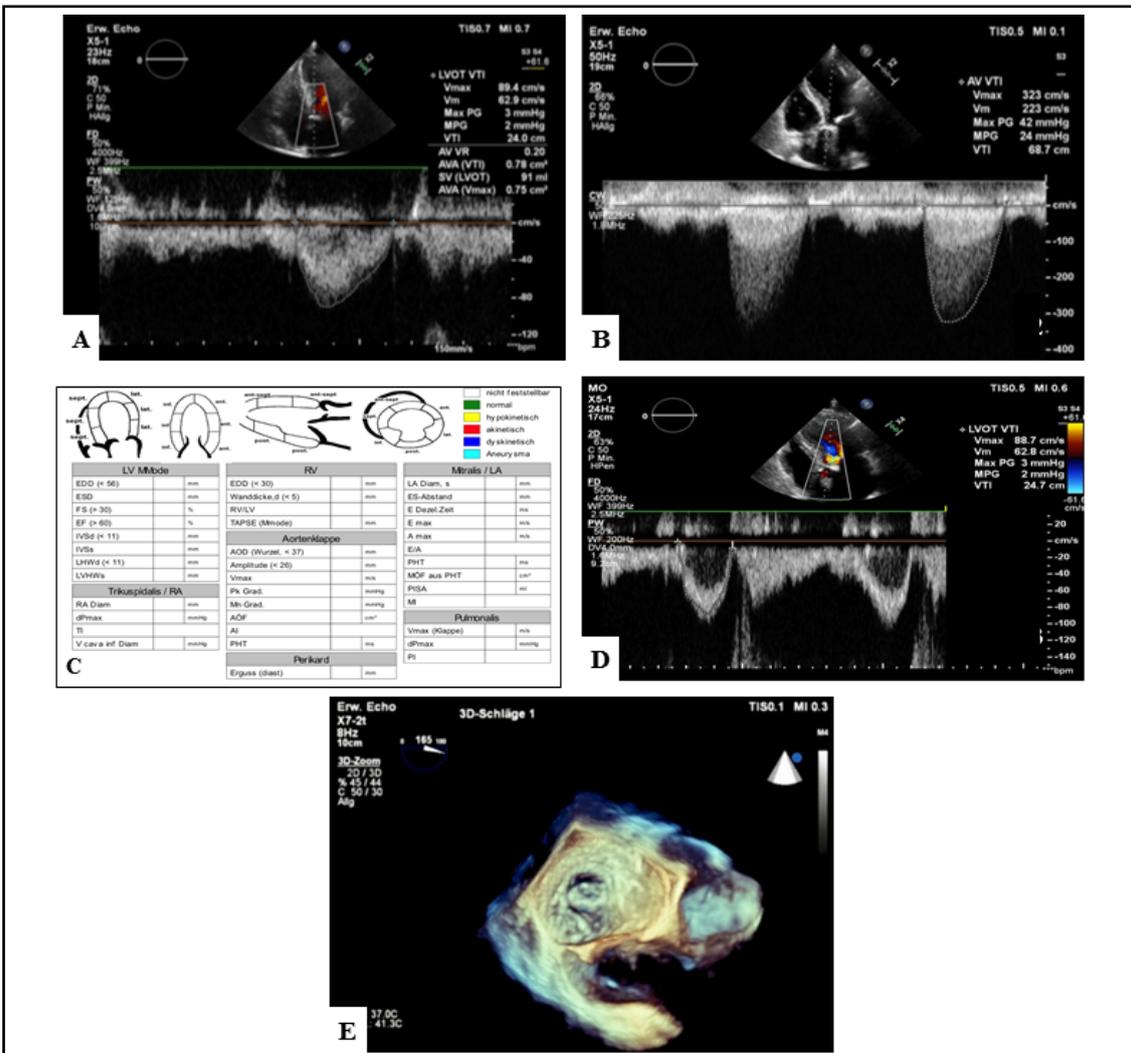
### 5.1.3 Klappenmorphologie

Die Klappenmorphologie wird im klinischen Alltag initial durch die Rekonstruktion der Echokardiographie (TTE, TEE) realisiert. Hierbei folgt eine klare Definition von Klappenöffnungsfläche, Blutfluss, Druckdifferenzen vor und nach der Klappe und ggf. eine Beschreibung von möglichen Veränderungen der Klappenstruktur.

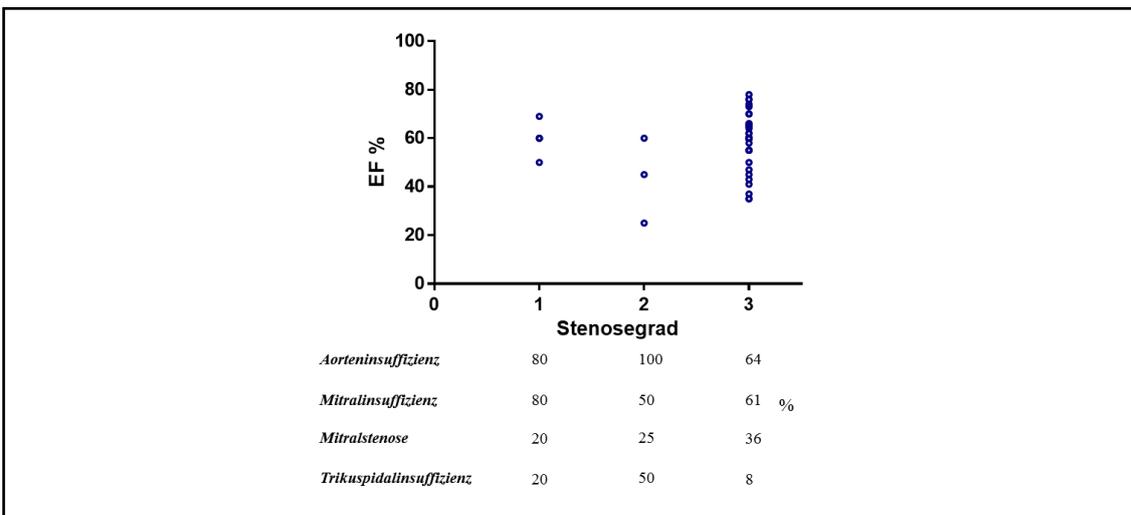
Eine Spezifizierung der Klappenmorphologie erfolgt nach makroskopischer Inaugenscheinnahme durch den Herzchirurgen. Weiterführend kann die Morphologie auf struktureller Ebene durch histochemische und immunhistologische Analysen spezifiziert werden. Dieser Reihenfolge der Beschreibung einer veränderten Klappenmorphologie folgt die nachstehende Ergebnisdarstellung.

Für alle Patienten konnten präoperative echokardiographische Befunde erfasst werden. Exemplarisch werden nachfolgend echokardiographische Befunde verschiedengradiger Aortenklappenstenosen dargestellt. Für die Graduierung wurde die maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe sowie der Transvalvuläre Druckgradient gemessen und die Klappenöffnungsfläche bestimmt ( $V_{max} > 4\text{m/s}$ ,  $\Delta P > 40\text{mmHg}$  KÖF  $< 1,0\text{ cm}^2$ ). Für die Berechnung der Klappenöffnungsfläche muss die Breite (d) des linksventrikulären Ausflusstrakts sowie die Geschwindigkeit über dem linksventrikulären Ausflusstrakt gemessen werden. Das Ultraschallgerät ist anschließend in der Lage über die Formel:  $KÖF = \pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 \times \frac{V_{LVOT}}{V_{max}}$ , die Klappenöffnungsfläche, als wesentlichen Bestandteil der Graduierung der Aortenklappenstenose, zu berechnen.

Die makroskopische Beurteilung der Herzklappen und die histologische Aufbereitung werden in den Kapiteln 5.2.3 und 5.3.2 dargestellt. Ziel der chronologischen Abbildung ist es, den klinischen Prozess des Erkenntnisgewinns, beginnend mit Echokardiographie, über Diskriminierung von Risikoprofilen bis letztlich zur Beurteilung der exstirpierten Herzklappe, darzustellen.



**Abbildung 12:** A : Präoperativer echokardiographischer Befund eines 70-jährigen svHD-Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose. B: Echokardiographischer Befund eines 69-jährigen Patienten mit mittelgradiger Aortenklappenstenose. C: Ultraschall-Befundbogen der LMU; D: Messung der Vmax über dem linksventrikulären Ausflusstrakt für die Berechnung der KÖF; E: 3D- Rekonstruktion einer hochgradigen Aortenklappenstenose eines 62-jährigen Patienten. Alle Untersuchungen wurden an der Herzchirurgischen Poliklinik durchgeführt und dokumentiert. Alle Patienten stammen aus der svHD-Kohorte der vorliegenden Studie



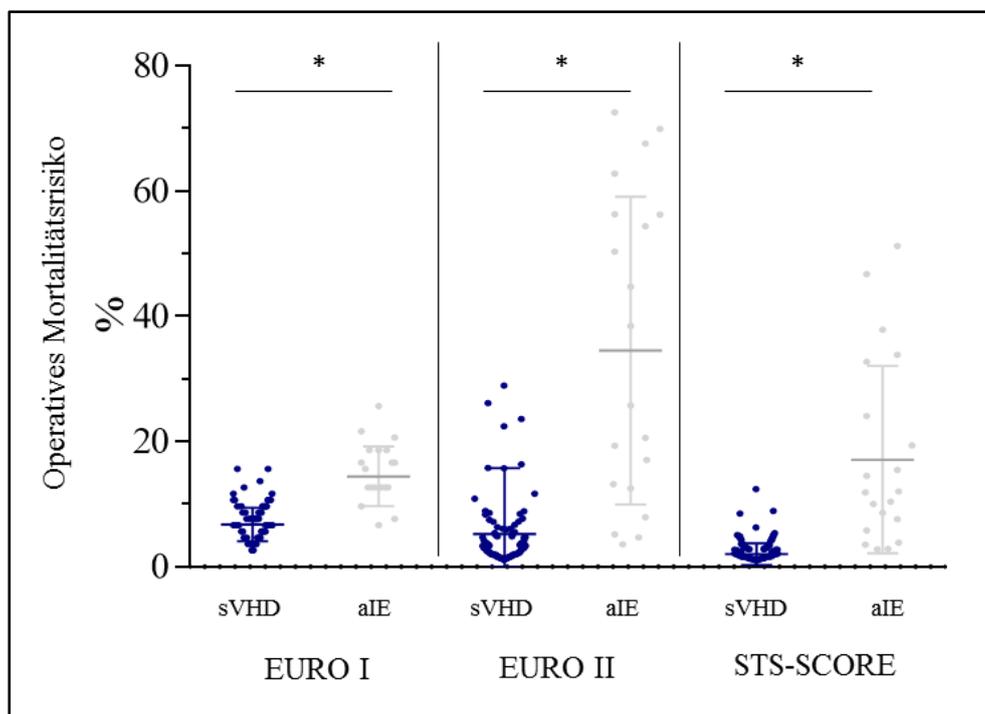
**Abbildung 13:** Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) aller eingeschlossenen Patienten. Prozentuale Verteilung der erkrankten Herzklappen.

## 5.2 Operationsbezogene Daten

### 5.2.1 Risiko-SCORE-Analyse

Über die Erfassung der im Methodenteil genannten individuellen präoperativen klinischen Parameter (Alter, Geschlecht, Nierenfunktion, Voroperationen, chronische Lungenerkrankung, Diabetes, NYHA-Stadium, pulmonaler Hypertonus, kardiale Voroperationen, Art des herzchirurgischen Eingriffs, präoperativer Kreatininwert, Grad der Stenosierung bei bekannter KHK, Herzrhythmusstörungen, präoperativer Bedarf an Katecholaminen) konnte mithilfe der 3 Mortalitäts-Scores (EURO I, EURO II, STS) für jeden Patienten ein individuelles operatives Mortalitätsrisiko berechnet werden. So wiesen die Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung im Mittel ein Risiko von  $6,79 \pm 2,67\%$  (Euro SCORE I),  $5,22 \pm 1,06\%$  (EURO II),  $2,02 \pm 0,17\%$  (STS-SCORE) auf. Entsprechend der Risikogruppeneinteilung nach Nashef et.al. 1999 [119], Kuck et.al.2015 [120] und Balan et.al. 2017 [121] wiesen die Patienten im Durchschnitt ein mittleres (STS und EURO II) bis hohes (EURO I) operatives Risiko auf.

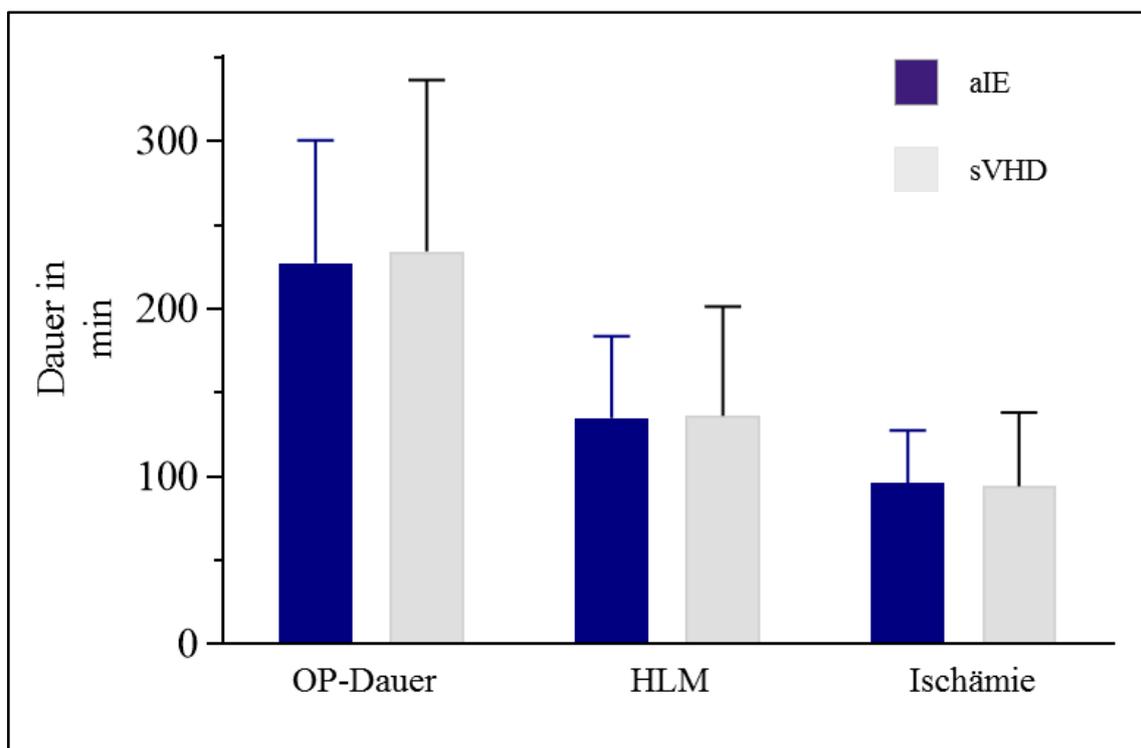
Im Vergleich dazu wiesen die Patienten mit akut infektiöser Endokarditis ein signifikant höheres ( $p < 0,0001$ ) berechnetes operatives Risiko auf, als die Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Individuelles operatives Mortalitätsrisiko der 2 Kohorten (1 sVHD, 2 aIE) berechnet mit den online-verfügbaren Scores: EURO I, EURO II, STS-Score (2017); Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied des berechneten operativen Risikos ( $p < 0,0001$ ).

### 5.2.2 Intraoperative Verlaufsdaten

Alle Patienten wurden an der Herz-Lungen-Maschine, unter Abklemmung der Aorta (Ischämiezeit), operiert. Die mittlere OP-Dauer der Kohorte 1 (sVHD) betrug  $227 \pm 7$  min, die mittlere Zeit an der HLM  $135 \pm 48$  min und die mittlere Ischämiezeit lag im Schnitt bei  $96 \pm 31$  min. Ähnliche, d.h. signifikant nicht unterschiedliche Zeiten, konnten in der Gruppe der akut infektiösen Endokarditis gemessen werden.



**Abbildung 15:** Vergleich der intraoperativen Verlaufsdaten der 2 Kohorten (sVHD, aIE). Es konnte kein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) in der Dauer der OP, HLM-Zeit und Ischämie-Zeit zwischen den beiden Kohorten gezeigt werden.

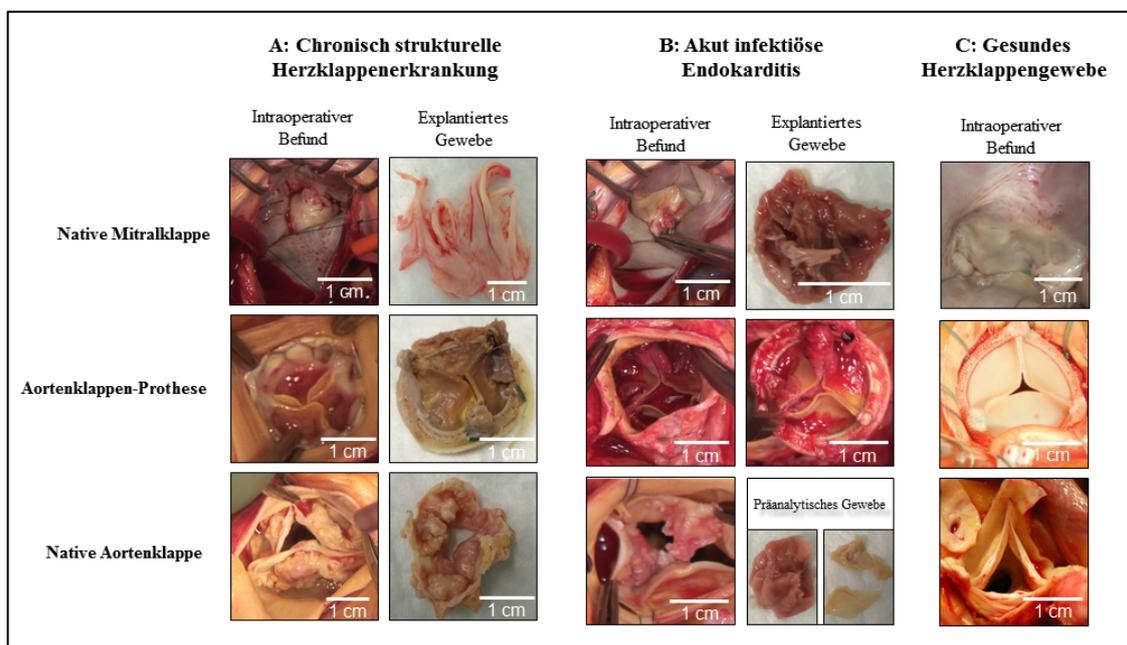
### 5.2.3 Makroskopische Graduierung

Intraoperativ erfolgte die Inspektion der erkrankten Herzklappe, mit anschließender Graduierung und Dokumentation des Verkalkungsgrades (siehe Abbildung 16 A-C).

Eine native Herzklappe ist gekennzeichnet durch gute strukturelle Abgrenzung zwischen Segel, Taschen und Anulus, ein nachvollziehbarer Klappenschluss und kein Anzeichen von Auflagerung oder Verkalkung (Siehe Abbildung 16 C).

Dem gegenüber zeigen sich bei der strukturellen Herzklappenerkrankung Kalkplaques, die teilweise oder vollständig den Klappenanulus umschließen und die Klappensegel

respektive die Taschen infiltrieren (Siehe Abbildung 16 B). Hierdurch kommt es zum teilweise oder vollständigen Verlust des Klappenschlusses und/oder der Klappenöffnung. Die makroskopische Beurteilung der Klappenmorphologie ist abhängig vom Operateur und unterliegt keiner standardisierten Klassifikation. Hierdurch kommt es in Einzelfällen auch zu unklaren Befundungen in denen eine Verkalkung der Herzklappe mit auflösender Struktur auch als infektiös charakterisiert werden kann (siehe Abbildung 16 A und B). Die explantierten Herzklappen konnten von den zuständigen Operateuren folgendermaßen unterteilt werden: 62% massiv verkalkt, 21% deutlich verkalkt und 8% leicht verkalkt. Bei 9% der Patienten ließ die Dokumentation keinen eindeutigen makroskopischen Befund zu.



**Abbildung 16:** Intraoperative makroskopische Beurteilung der erkrankten und gesunden Herzklappen. A: Die Aortenklappenprothesen zeigen eine deutliche Destruktion und Verkalkung. Die glänzenden Auflagerungen zeigen Ähnlichkeiten zu den thrombotischen Auflagerungen in akut infektiösem Klappengewebe (B: Klappenprothese). Die massiven Kalkplaques auf der nativen Aortenklappe (A) können makroskopisch nicht eindeutig von einer akut infektiösen Auflagerung (B: native Klappe) abgegrenzt werden. B: Aortenklappenprothesen mit Endokarditis-typischen thrombotischen Auflagerungen. Im Vergleich dazu weisen die gesunden Herzklappen (C) eine glatte Oberfläche ohne Verkalkung und Vegetation auf.

Endokarditis-typische Befunde wie Abszesse oder thrombotische Vegetationen konnten bei der makroskopischen Betrachtung der chronisch strukturell veränderten Herzklappen im Gegensatz zu den akut infizierten Herzklappen nicht nachgewiesen werden.

### 5.3 Analyse des Herzklappengewebes

Das Herzklappengewebe wurde sofort nach Exstirpation unter sterilen Kautelen präpariert und jeweils mikrobiologischer, histopathologischer und molekularbiologischer Diagnostik zugeführt. Dabei wurde strengstens darauf geachtet, dass die makroskopisch auffälligen Strukturen jeder weiterführenden diagnostischen Untersuchung zur Verfügung gestellt wurden. Die Standarduntersuchung beinhaltet eine mikrobiologische Diagnostik des Herzklappengewebes, obgleich die von uns angestrebte mikrobiologische Diagnostik der Blutkultur erwartungsgemäß von der Kontrollgruppe und der Gruppe der chronisch strukturellen Herzklappenerkrankungen negativ imponierte.

Die Kohorte der akut infektiösen Endokarditis zeigt ein Erregerspektrum im Blut von: *Staphylococcus aureus*, *Streptokokkus pyogenes*, *Koagulase-neg. Staphylokokken.*, *Enterococcus faecalis+faecium u.a.*

Im Detail zeigen sich nachfolgende Befundergebnisse.

#### 5.3.1 Mikrobiologie

Wie zuvor erwähnt, ist es intraoperativ makroskopisch nicht immer möglich sicher zwischen einer akut bakteriellen Infektion und einer chronisch strukturell veränderten, nicht infektiösen Herzklappe zu unterscheiden. So entschieden sich die zuständigen Operateure bei 7% der Patienten mit sVHD das explantierte Herzklappengewebe im Max-Planck-Institut mikrobiologisch untersuchen zu lassen. In keiner dieser 7 Herzklappen konnten bakterielle Erreger oder deren genetisches Material mit der standardmäßig durchgeführten Gewebekultur oder der RT-PCR nachgewiesen werden.

Die mikrobiologische Diagnostik im Speziallabor wurde hingegen bei allen 100 Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Obwohl präoperativ bei keinem der 100 Patienten der Verdacht auf eine bakteriell bedingte, akut infektiöse Endokarditis bestand, konnten bemerkenswerterweise aus 5 der 100 untersuchten Gewebe bakterielle Erreger, nach Vorbehandlung im Ultraschallbad, mikrobiologisch angezchtet werden. Es konnten folgende Erreger in den Kultur-positiven Gewebeproben nachgewiesen werden: *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* und *Staphylococcus warneri*. In der histopathologischen Untersuchung konnten alle 5 Klappen als chronisch strukturelle Herzklappenerkrankung mit deutlicher Fibrosierung und Kalzifikation identifiziert werden.

Über die im Methodenteil beschriebenen immunhistochemischen Antikörper-Färbungen konnten die Bakterien intramural, tief eingebettet im verkalkten und fibrotischen Gewebe, nachgewiesen werden. In der Abbildung 17 (Seite 54) werden 4 dieser 5 Kulturpositiven Herzklappen histopathologisch sowie immunhistochemisch dargestellt.

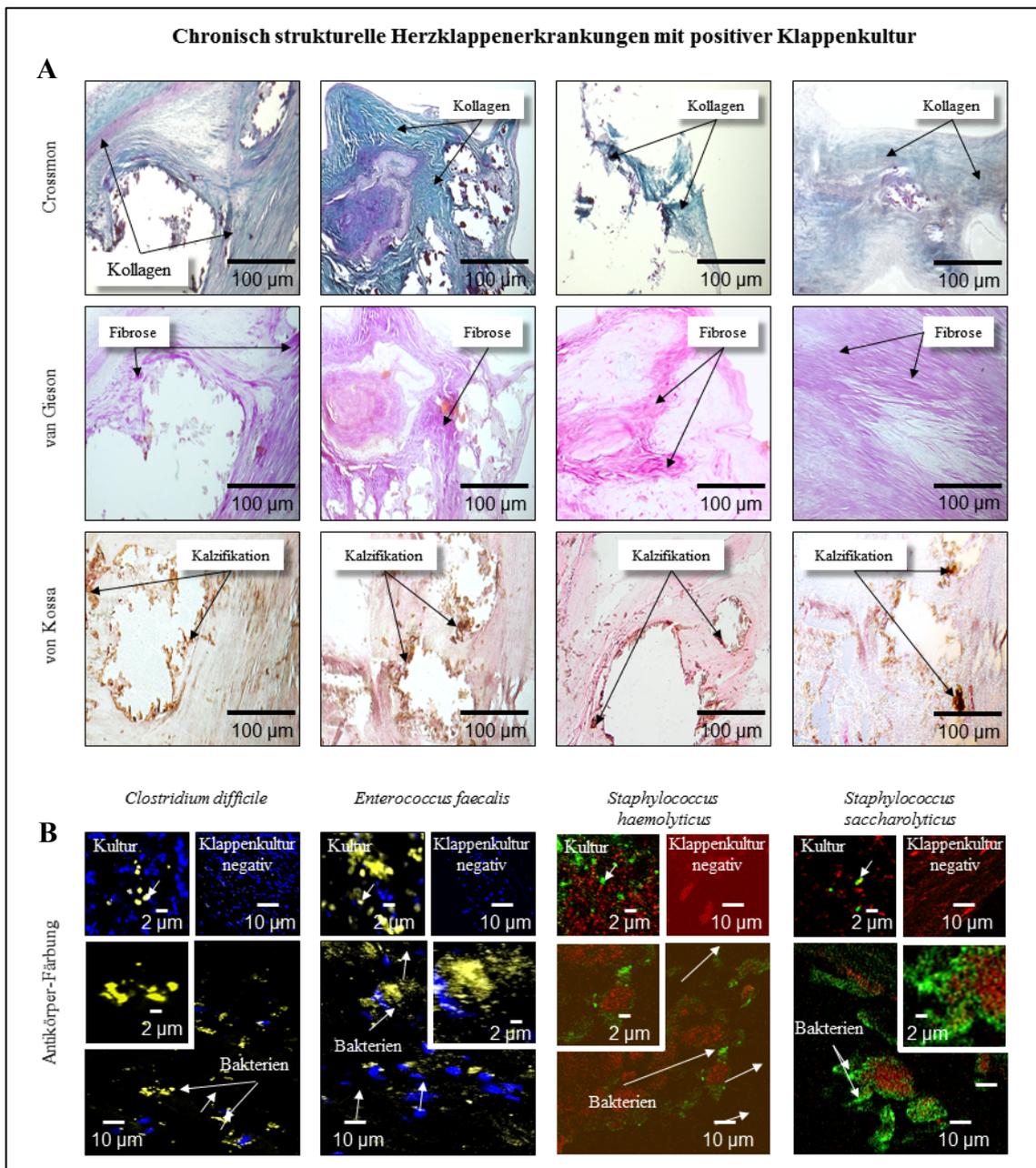
### **5.3.2 Histopathologie**

Die Beurteilung der histopathologischen Veränderungen erfolgte zum einen (n=15) durch das Pathologische Institut der LMU, als auch bei allen explantierten Herzklappen (n=133) zweizeitig durch das Fraunhoferinstitut Leipzig. Einheitliche Kriterien für die Diagnose richten sich nach den von-Reyn-Kriterien und werden untermauert durch den Nachweis von Fibrosierung über die van-Gieson-Färbung, Verkalkung via von-Kossa-Färbung und der invasiven Infiltration von Bakterien über die immunhistochemische Antikörper-Färbung (siehe Abbildung 17).

Von den 100 chronisch strukturell veränderten Herzklappen wurden 15% in das Pathologische Institut der LMU geschickt und einer histopathologischen Untersuchung unterzogen. Keine der 15 untersuchten Herzklappen wies in den Standardfärbungen (HE, EvG, PAS-Färbung) Zeichen einer akuten Infektion auf. Außerdem konnte in keiner strukturell veränderten Herzklappe ein mikroskopischer Erregernachweis erbracht werden. Im untersuchten Gewebe konnten weder Vegetationen noch Abszesse oder Entzündungsinfiltrate mit polymorphonukleären Leukozyten, als Zeichen einer akut infektiösen Endokarditis, nachgewiesen werden.

Das untersuchte Klappengewebe zeigte eine vermehrte Fibrosierung und Sklerose der Intima und Media, herdförmige grobschollige Verkalkung mit fokalem Nachweis von Schaumzellen sowie Entzündungsinfiltrate, bestehend aus Lymphozyten, Plasmazellen und Histiozyten, als Zeichen einer chronischen Inflammation. In der speziellen histopathologischen Untersuchung (Crossmon-, van-Gieson, von-Kossa-Färbung) konnten Unterschiede zwischen akut infektiösem Klappengewebe und chronisch strukturell verändertem Gewebe gezeigt werden. So konnte über die Crossmon-Färbung im akut infektiösen Herzklappengewebe ein dichtes Entzündungszellinfiltrat mit zahlreichen neutrophilen Granulozyten, im Vergleich zu den nur vereinzelt

vorkommenden Immunzellen in chronisch strukturell verändertem Gewebe lichtmikroskopisch dargestellt werden.

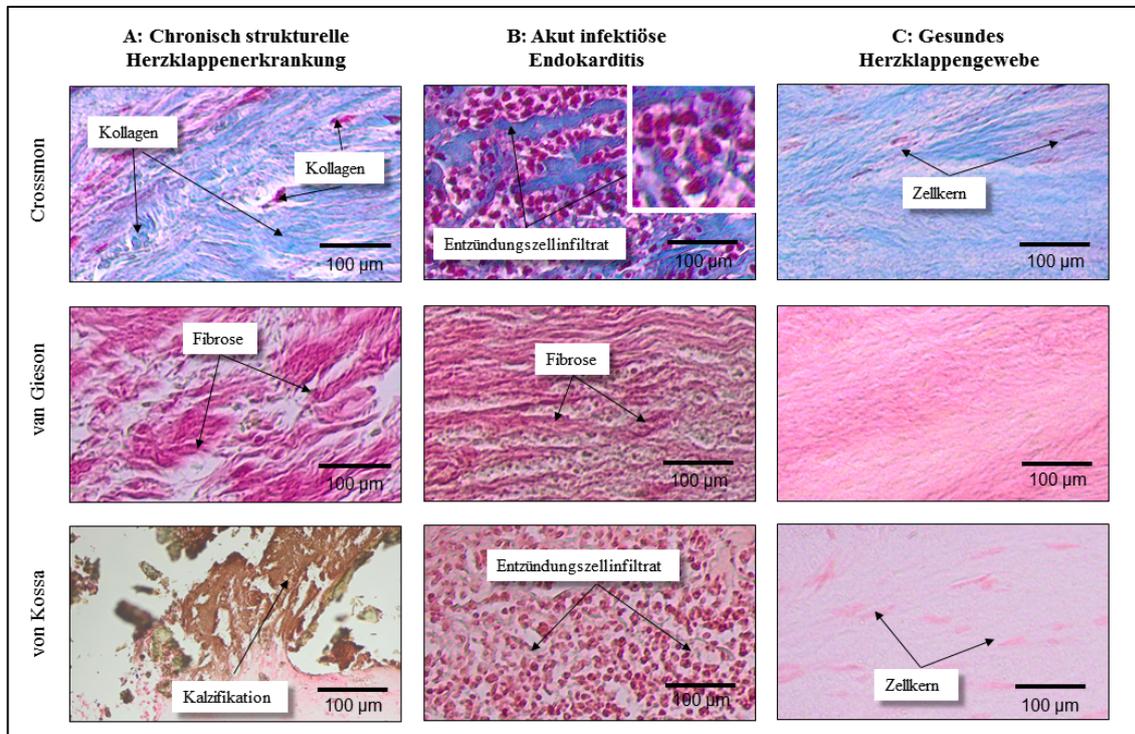


**Abbildung 17:** Histopathologische Untersuchung der Kultur-positiven sVHD – Klappengewebe  
 A: Die Crossmon-Färbung zeigt dichte Kollagenfaserbündel, die van-Gieson-Färbung eine charakteristische Fibrosierung und die von-Kossa-Färbung eine deutliche Kalzifikation, als typische Merkmale einer chronisch strukturell veränderten Herzklappe.  
 B: Über die immunhistochemische Antikörper-Färbung konnten die bakteriellen Erreger in chronisch strukturell verändertem Herzklappengewebe dargestellt werden.

Sowohl akut infiziertes Gewebe als auch chronisch verändertes Gewebe stellte sich in der van-Gieson-Färbung mit einer deutlichen Fibrosierung dar, wenn auch in chronisch strukturell veränderten Herzklappen in deutlich ausgeprägterer Form.

Die von-Kossa-Färbung, zur speziellen Darstellung von Kalzifikationen, zeigte in chronisch strukturellen Herzklappenveränderungen massive Kalkablagerungen, während in akut infektiösem Gewebe nur vereinzelte Kalkstrukturen nachweisbar waren.

In der nachfolgenden Abbildung (Abbildung 18) werden 3 Gewebeschnitte (gesundes Gewebe, aIE, sVHD) in den 3 genannten Färbungen dargestellt.

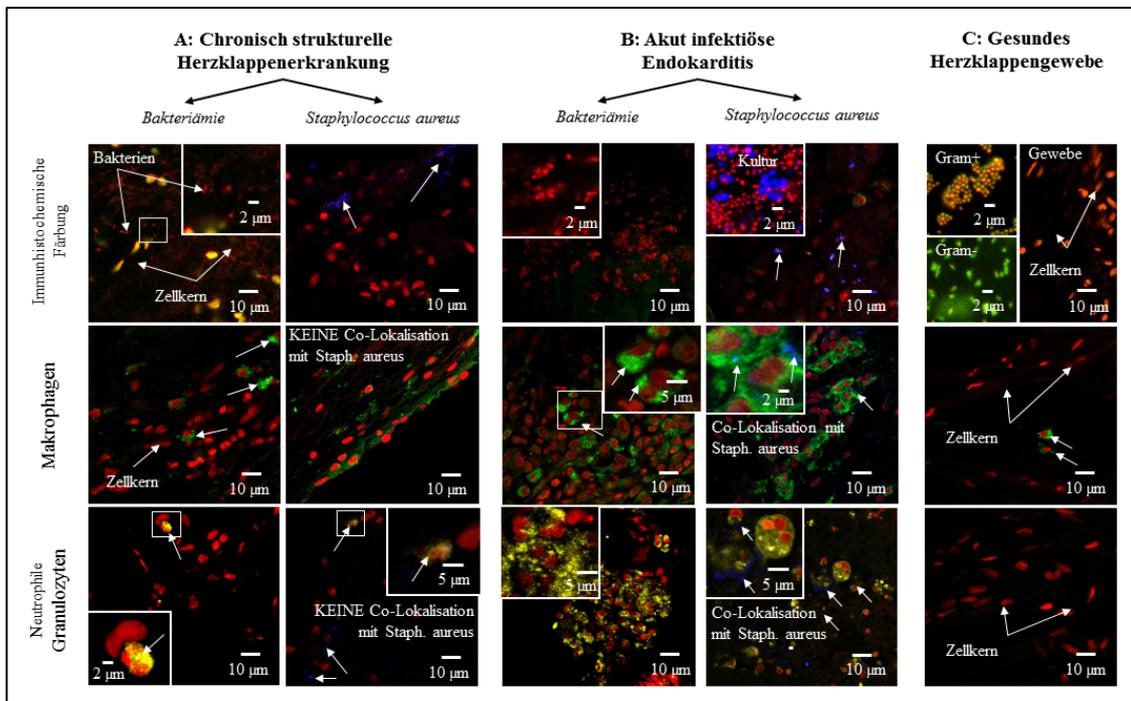


**Abbildung 18:** Färbung und histopathologische Untersuchung des Klappengewebes. A: Deutliche Fibrosierung (van Gieson) und Verkalkung (von Kossa) B: Neben der Fibrosierung ist auch ein deutliches Entzündungszellinfiltrat erkennbar. C: Gesundes Klappengewebe weist keine Fibrose und nur lockere Kollagenfaserbündel (Crossmon) auf.

Außerdem wurden das infizierte Herzklappengewebe (*Staph. aureus* pos. DNA) über Fluoreszenz- und Immunfluoreszenzfärbungen gefärbt und histopathologisch untersucht. Als Negativ-Kontrolle wurde nicht-infiziertes Herzklappengewebe verwendet, als Positiv-Kontrolle Monokulturen von *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ). Damit soll gezeigt werden, dass über die verwendeten Färbungen beide Bakterienarten angefärbt und dargestellt werden können.

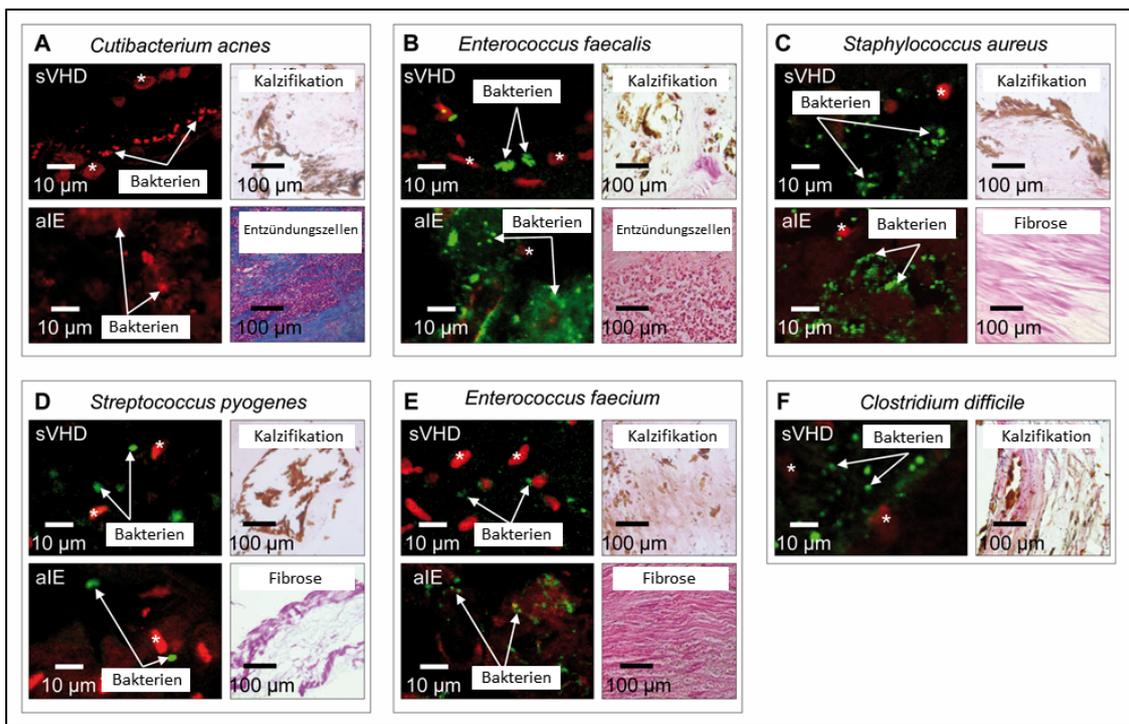
In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 19) werden exemplarische Gewebeschnitte gezeigt. Dabei erfolgte der unspezifische Erregernachweis in der Hexidim-Iodid-Färbung, mit der Bakterien und große Eukaryotische Zellkerne rot angefärbt werden. Die immunhistochemischen Färbungen wurden für die spezifische Darstellung von *Staphylococcus aureus* (anti-*Staph. aureus* Antikörper 704, blau), infiltrierte Makrophagen (CD 14 Antikörper, grün) und neutrophile Granulozyten (CEACAM-

6/CD66c Antikörper, gelb) verwendet. Sowohl in akut infektiösem Klappengewebe als auch in chronisch strukturell veränderten Herzklappen konnte *Staphylococcus aureus* immunhistochemisch nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich in den akut infektiösen Klappen deutlich mehr Bakterien und eine Co-Lokalisation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als in den Klappen mit sVHD.



**Abbildung 19:** Immunhistochemische Färbung des explantierten Klappengewebes A: Nachweis von *Staph. aureus* über die immunhistochemische Antikörper-Färbung im chronisch strukturell veränderten Klappengewebe. Im Gegensatz zur akut infektiösen Endokarditis (B) konnte im sVHD-Gewebe keine Co-Lokalisation von *Staph. aureus* mit Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten gezeigt werden. Die Erreger verteilten sich disseminiert im Klappengewebe. C: Im gesunden Klappengewebe konnten erwartungsgemäß keine Bakterien immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Neben *Staphylococcus aureus* konnten auch die anderen 5 untersuchten bakteriellen Erreger immunhistochemisch im Herzklappengewebe nachgewiesen werden. Die Erreger zeigten sich intramural, tief eingebettet in der Kalzifikation und Fibrose der chronisch strukturell veränderten Herzklappen (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Immunhistochemische Darstellung der bakteriellen Erreger im kalzifizierten Klappengewebe. Alle 6 Bakterienspezies zeigen sich intramural eingebettet in Kalzifikation und Fibrose. A/B: *Cutibacterium acnes* und *Enterococcus faecalis* lagern sich in einem dichten Entzündungszellinfiltrat im Herzklappengewebe ab.

### 5.3.3 Molekularbiologie

Die molekularbiologische Untersuchung des explantierten Herzklappengewebes erfolgte über eine quantitative TaqMan-PCR.

Diese quantitative Analyse der ausgewählten bakteriellen Spezies *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* + *faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalcatiae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium difficile*, ergab für die Kontrollkohorte (Kohorte ohne Anzeichen für Infektion oder Verkalkung) durchwegs negative Ergebnisse.

Die chronisch strukturellen Herzklappenerkrankungen dementsprechend zeigen ein inter- und intraindividuelles Expressionsprofil der quantitativen Taq-PCR im Hinblick auf das Erregerprofil (siehe Abbildung 21)

Insgesamt wurde in 72 von 100 chronisch strukturell veränderten Klappen genetisches Material der zuvor genannten Bakterien gefunden.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 21) zeigt die Ergebnisse der PCR Untersuchung der beiden Kohorten (aIE und sVHD) und zeigt sowohl in der Kohorte mit akut infektiöser Endokarditis als auch der Kohorte mit chronisch strukturell veränderten Herzklappen eine polymikrobielle Besiedlung.

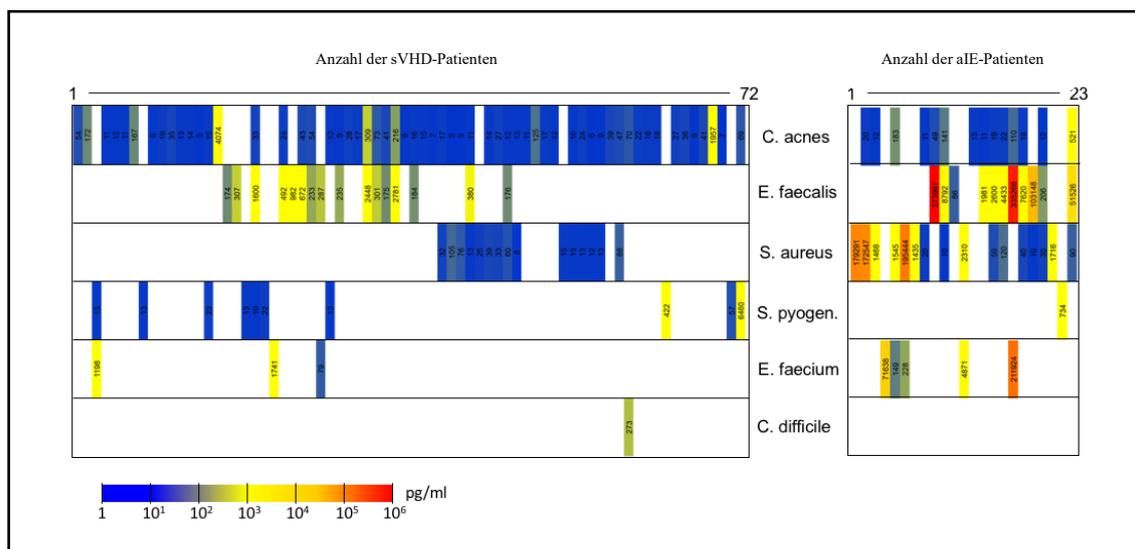
Insgesamt konnte in der Kohorte der sVHD in 3% eine Besiedlung mit 3 Keimen, in 28% mit 2 Keimen und in 44% eine unibakterielle Besiedlung nachgewiesen werden. 28 der 100 chronisch strukturell veränderten Herzklappen wiesen eine negative PCR auf.

Die Klappen der aIE-Kohorte waren in 22% mit einem bakteriellen Erreger besiedelt. In 43,5% der akut infizierten Klappen konnten 2 bakterielle Erreger via PCR im Klappengewebe nachgewiesen werden, während 30,5% der Klappen mit 3 Keimen und 4% der Klappen mit 4 bakteriellen Erregern besiedelt waren.

Über die TaqMan-PCR kann nicht nur genetisches Material nachgewiesen, sondern auch die genaue Menge genetischen Materials quantifiziert werden.

So werden in der nachfolgenden Abbildung (siehe Abb. 21) die Konzentrationen bakterieller DNA aus chronisch strukturell veränderten sowie akut infektiösen Herzklappen miteinander verglichen und graphisch dargestellt.

Alle 23 untersuchten akut infektiösen Klappen lieferten eine positive Klappenkultur und dementsprechend konnte auch das genetische Material der Bakterien über die TaqMan-PCR in allen Klappen nachgewiesen werden.



**Abbildung 21:** In 72 von 100 chronisch strukturell veränderten Herzklappen konnte genetisches Material der obengenannten Bakterien über die TaqMan-PCR nachgewiesen werden.

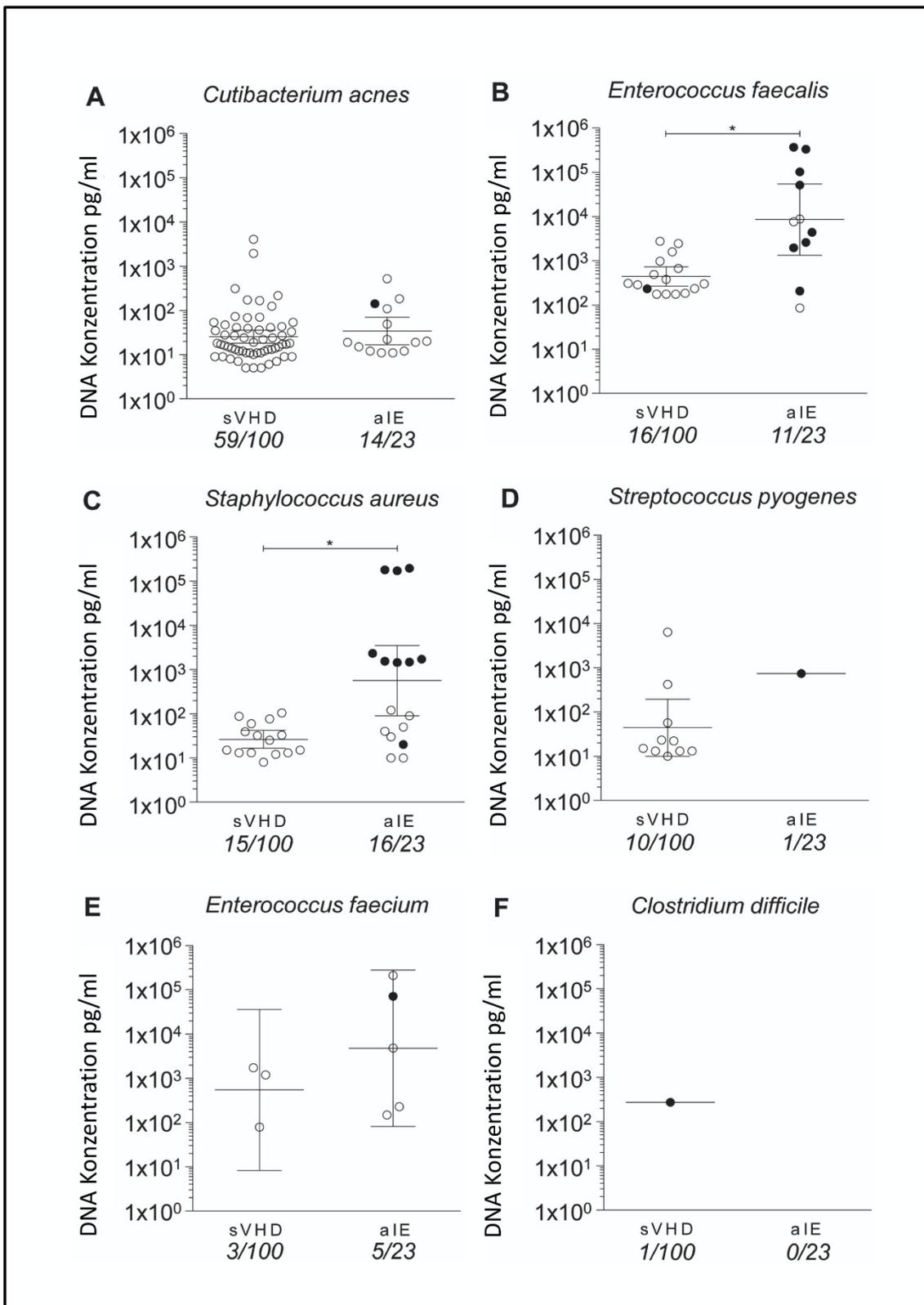
In der nachfolgenden Graphik werden die Konzentrationen der TaqMan-PCR-Untersuchungen der 6 Keime (*Staph. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pyogenes*, *Strept. agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*) jeweils im Vergleich zwischen chronisch struktureller und akut infektiöser Herzklappenerkrankung dargestellt. Der häufigste molekularbiologisch nachgewiesene

Erreger war *Cutibacterium acnes*, dessen genetisches Material aus 59 von 100 strukturell veränderten Herzklappen extrahiert werden konnte.

Alle 23 akut infizierten Herzklappen wiesen eine positive Klappenkultur mit einem der obengenannten Keime auf. In der molekularbiologischen PCR Untersuchung hingegen konnte bei den meisten Endokarditiden, wie in Abbildung 21 dargestellt, eine polymikrobielle Besiedlung mit mehr als einem bakteriellen Erreger nachgewiesen werden.

Die nachfolgenden Graphiken zeigen, dass die Menge der amplifizierten bakteriellen DNA in den meisten akut infizierten Herzklappen deutlich höher war, als in chronisch strukturell veränderten Klappen (siehe Abbildung 22: *Enterococcus faecalis*). Ein Teil der untersuchten sVHD-Klappen zeichnet sich jedoch durch den Nachweis ähnlich hoher bakterieller DNA-Konzentrationen wie in den untersuchten aIE-Klappen aus (siehe Abbildungen 22: *Cutibacterium acnes*).

Das bakterielle Genom der beiden Keime *Klebsiella pneumoniae* und *Streptococcus agalactiae* konnte nicht im sVHD-Klappengewebe nachgewiesen werden.



**Abbildung 22:** Quantitative TaqMan-PCR-Analyse der 100 sVHD und 23 aIE-Klappen. Für 6 der 8 gemessenen Keime konnte bakterielle DNA im Gewebe chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen nachgewiesen werden. Auffällig ist die vergleichbare Menge der DNA-Konzentration von *Cutibacterium acnes* im sVHD- und aIE-Klappengewebe.

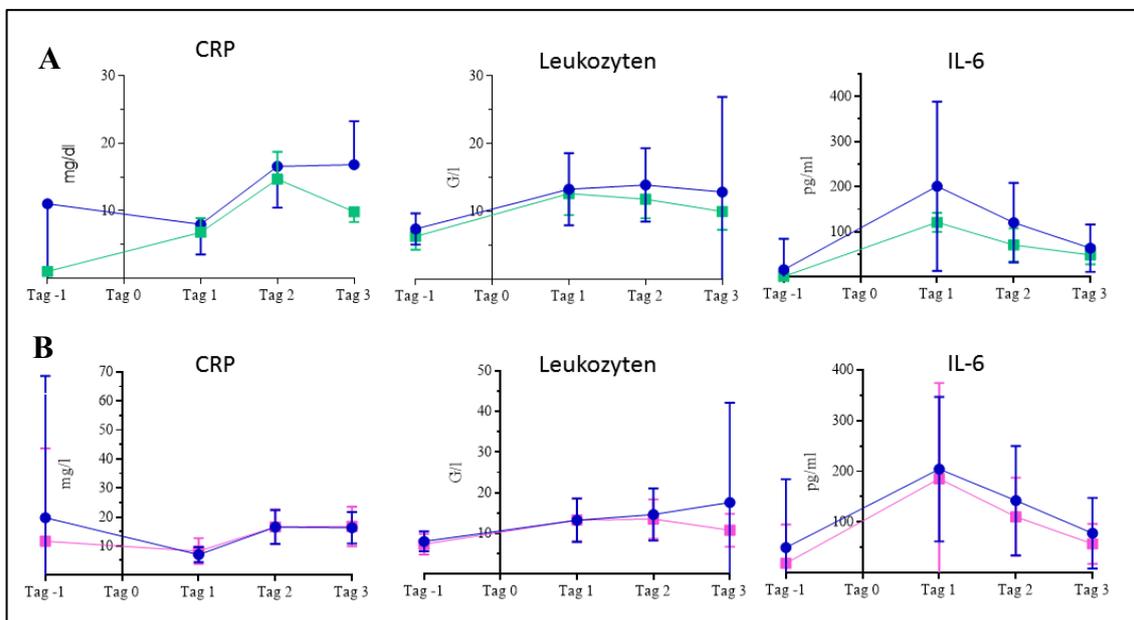
## 5.4 Postoperativer Verlauf

### 5.4.1 Reaktion des Immunsystems

Im Rahmen des Aufenthaltes auf der Intensivstation erfolgte bei jedem Patienten die regelmäßige Bestimmung der laborchemischen Entzündungsparameter (CRP, Leukos, IL-6). Im Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden die Entzündungswerte des 1., 2. und 3. postoperativen Tages erfasst und graphisch dargestellt. In folgender Graphik werden die Patienten mit sVHD ohne positiver Klappenkultur (blau) mit den Patienten mit sVHD mit positiver Klappenkultur (grün) (Abb. 23 A) verglichen. Außerdem erfolgte ein Vergleich der postoperativen Entzündungswerte der PCR-positiven Patienten mit den PCR-negativen sVHD-Patienten (Abb. 23 B).

Zwischen den Patienten mit Kultur-positiver und Kultur-negativer sVHD konnte kein signifikanter Unterschied in der Konzentration der postoperativ gemessenen Entzündungsparameter nachgewiesen werden (CRP  $p=0,213$ ; Leukozyten  $p=0,444$ ; IL-6  $p=0,428$ ).

Auch der Vergleich der PCR-positiven Klappen ( $n=72$ ) mit den PCR-negativen Klappen ( $n=32$ ) zeigte keinen signifikanten Unterschied im Verlauf der postoperativ gemessenen Entzündungsparameter.



**Abbildung 23:** Entzündungsparameter im postoperativen Verlauf

A: sVHD Kultur negativ (blau), sVHD Kultur positiv (grün);

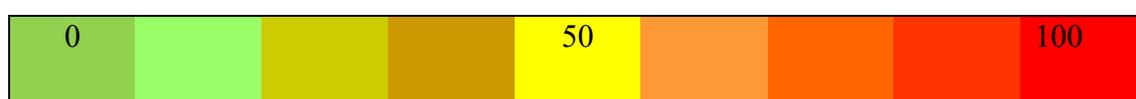
B: sVHD PCR negativ (blau) und sVHD PCR positiv (lila)

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Verlauf der laborchemischen Entzündungsparameter gezeigt werden.

## 5.4.2 Postoperative Komplikationen

In der nachfolgenden Tabelle (Abb. 24) werden die postoperativen Komplikationsraten der Kohorten dargestellt. Dabei sind die relativen Häufigkeiten in Prozent angegeben. Die Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung wurden in die 2 Subgruppen Kultur-positiv und TaqMan-positiv unterteilt und mit den Komplikationsraten der Patienten mit akut infektiöser Endokarditis verglichen. Hinter der Häufigkeitsangabe (%) wird der p-Wert, berechnet mit Fisher's exaktem Test, als Dezimalzahl in der Klammer angegeben. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wird als statistisch signifikant angesehen.

Zwischen der Kultur-positiven Subgruppe und der Kohorte mit akut infektiöser Endokarditis konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Rate der postoperativen Komplikationen gezeigt werden.



Neurologische Dysfunktion	11 (0,0027)*	20 (0,626)	8 (0,0013)*	39
Re-Intervention	18 (0,086)	20 (0,99)	18 (0,155)	35
Dialysepflicht	7 (0,0159)*	0 (0,553)	6 (<0,001)*	26
Tracheotomie	2 (0,0111)*	0 (0,99)	3 (0,029)*	17
ECMO	2 (0,4657)	0 (0,99)	3 (0,569)	4
Herzrhythmusstörungen	42 (0,646)	20 (0,355)	43 (0,810)	48
Schrittmacherimplantation	7 (0,0047)*	0 (0,289)	4 (0,0016)*	30
Sepsis	8 (0,0242)*	0 (0,99)	10 (0,076)*	26
Respiratorische Insuffizienz	45 (0,058)	20 (0,99)	49 (0,029)*	22
	sVHD	sVHD Kultur+	sVHD TaqMan +	aIE

**Abbildung 24:** Prozentuale Verteilung der postoperativen Komplikationen der Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung sowie den Subgruppen Kultur+ und PCR+ im Vergleich mit den Patienten mit akut infektiöser Endokarditis. Berechnung der p-Werte über Fishers's exaktem Test. Es zeigte sich eine signifikant höhere Komplikationsrate bei Patienten mit akuter Infektion. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede in der postoperativen Komplikationsrate zwischen akuter Infektion und Kultur-positiver chronisch struktureller Herzklappenerkrankung gezeigt werden.

Mit dem Hintergrund einer möglichen infektiösen Pathogenese struktureller Herzklappenerkrankungen wäre es durchaus denkbar, dass erhöhte präoperative laborchemische Entzündungsparameter, als Hinweis für eine Infektion, mit einer größeren Anzahl an postoperativen Komplikationen assoziiert sind.

Der Zusammenhang zwischen der präoperativ gemessenen Konzentration von CRP, IL-6 und Leukozyten (metrische Variable) und der Anzahl der postoperativen Komplikationen (ordinalskalierte Variable) wurde unter Anwendung der Spearman-Korrelation analysiert. Die dafür durchgeführte Korrelationsanalyse zeigte allerdings keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der präoperativen laborchemischen Entzündungsparameter (CRP, IL-6, Leukozyten) und der Rate der postoperativen Komplikationen.

Die Korrelationskoeffizienten nach Spearman lagen bei 0,106 (CRP), 0,261 (Leukozyten), 0,046 (IL-6).

Die Höhe der präoperativ gemessenen Entzündungsparameter der Patienten mit akut infektiöser Endokarditis wiesen ebenfalls keine Korrelation zur Anzahl der postoperativ aufgetretenen Komplikationen auf.

### **5.4.3 Mortalitätsrate**

Im Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden alle Patienten hinsichtlich ihres Überlebens über einen postoperativen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet.

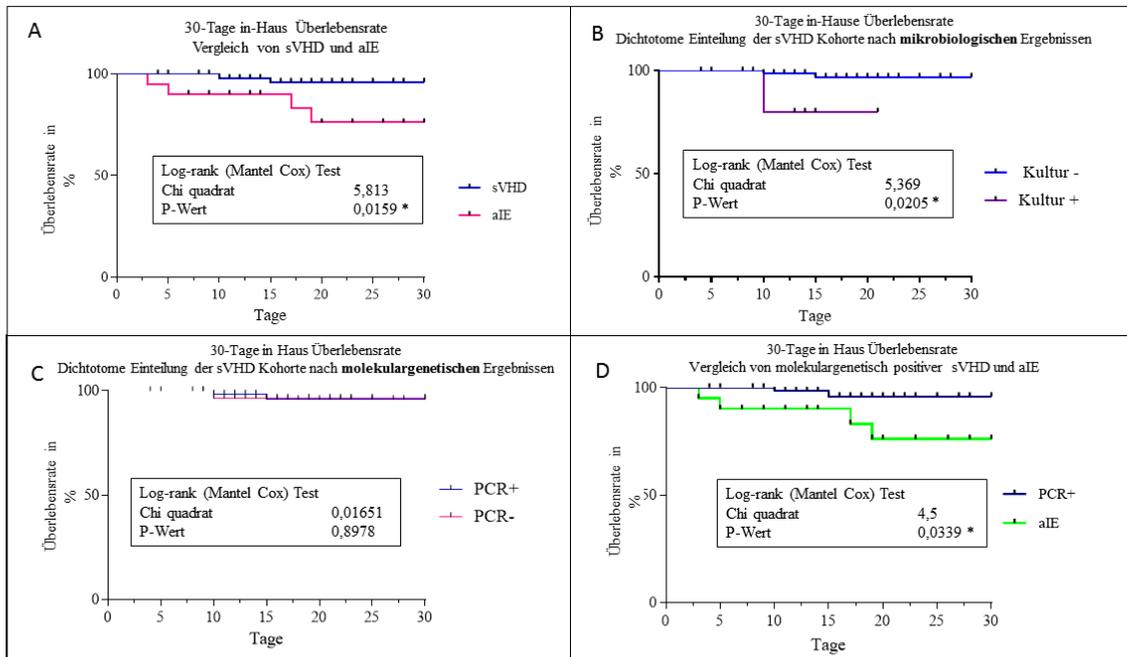
Von den 100 Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung verstarben 3 Patienten innerhalb von 30 Tagen nach der Operation. Ein weiterer Patient verstarb während seines Krankenhausaufenthalts am 33. postoperativen Tag auf der Intensivstation.

Als Todesursachen dieser Patienten konnten ein septisches Multiorganversagen, kardiogener Schock bei Multiorganversagen bzw. Perikardtamponade festgestellt werden.

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,0205$ ) in der 30-Tage-Überlebensrate zwischen der Kultur+ und der Kultur- Subgruppe der sVHD-Kohorte (siehe Abbildung 25 B).

Auch zwischen der Kohorte mit akut infektiöser Endokarditis und der Kohorte mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung sowie der PCR-positiven Subgruppe der sVHD-Kohorte konnte ein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden (siehe Abbildung 25 A und D). Die Patienten mit akut infektiöser Endokarditis wiesen damit

ein signifikant schlechteres 30-Tage-Überleben auf als die Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung.



**Abbildung 25:** 30-Tage Überlebensrate

Die Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung zeigten ein signifikant besseres 30-Tage Überleben als die Kohorte mit akut infektiöser Endokarditis (A und D). Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den sVHD-Patienten mit positiver Klappenkultur und den Patienten mit negativer Klappenkultur (B) festgestellt werden. Zwischen den molekulargenetisch positiv und negativen Gewebeproben konnte kein signifikanter Unterschied des 30-Tage-im-Haus-Überlebens festgestellt werden.

## 6 Diskussion

### *Allgemeine Aspekte der bakteriellen Infiltration der sVHD*

Die vorliegende wissenschaftliche Untersuchung adressiert das Vorkommen und die Häufigkeit von Endokarditis-assoziierten Bakterien in strukturell erkrankten Herzklappengeweben. Im Fokus wissenschaftlichen Interesses stehen dabei *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* und *faecalis*, *Streptokokkus pyogenes* und *agalactiae*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium difficile* sowie *Klebsiella pneumoniae*. Die Grundlage der Untersuchungsergebnisse bilden Herzklappengewebe einer Kohorte von 100 Patienten mit sVHD, nach Ausschluss einer akut infektiösen Endokarditis. Alle Gewebe wurden nach spezifischer Gewebepräparation einer mikrobiologisch-, kulturbasierten Diagnostik unterzogen. Hierbei erfolgte ein positiver Nachweis für *Staphylococcus haemolyticus*, *saccharolyticus* und *warneri*, *Enterococcus faecalis* und *Clostridium difficile* in jeweils einem Herzklappengewebe, respektive einem Patienten. Die Gewebepräparation der verkalkten, fibrosierten Herzklappen erfolgte hierbei, gegenüber bekannten Aufbereitungsprotokollen, in 3 Schritten. Durch mechanische und chemische Auftrennungsschritte wurden die Bakterien des sklerosierten Herzklappengewebes aus dem Zellverband gelöst und in einen planktonischen Zustand überführt.

In der Vergangenheit führte die Entwicklung molekularbiologischer Nachweisverfahren zur Etablierung von TaqMan-PCR-Methoden [17], die eine absolute Quantifizierung, bspw. der bakteriellen DNA in einem Gewebeverband, erlauben [127, 128].

Diese Methode wurde zur Untersuchung von 100 Herzklappengeweben von sVHD Patienten herangezogen. Es erfolgte ein Vergleich der bakteriellen DNA-Expression zwischen Herzklappengewebe von Patienten mit sVHD und Herzklappengewebe von Patienten mit dem Nachweis einer aIE. Dabei dienen die mikrobiologisch positiven Gewebe der aIE als Referenzkonzentration, um eine Schwelle der mittels PCR detektierten bakteriellen Konzentration und dem mikrobiologischen Kulturnachweis abzubilden. Somit gelingt es erstmalig, nicht nur das Vorhandensein von aIE assoziierten Erreger-DNA im verkalkten Herzklappengewebe nachzuweisen, sondern außerdem die Menge der DNA-Konzentration im Herzklappengewebe von sVHD Patienten abzuschätzen.

Diese Erkenntnisse haben weitreichende Konsequenzen im klinischen Alltag, sowohl für die Entwicklung und Etablierung von Routine-Diagnostikverfahren als auch für die Patientenselektion im Hinblick auf die Anwendung therapeutischer Interventionsverfahren von strukturell erkrankten Herzklappengeweben. Insbesondere die klinische Etablierung Katheter-basierter Herzklappenersatzverfahren (TAVI) benötigt eine explizite Risikostratifizierung des Patientenkontexts [90]. In einer Multizenterstudie von Regueiro et al. (2016) wurden 20.006 Patienten nach TAVI-Implantation im Hinblick auf die Entwicklung einer Prothesenendokarditis untersucht [129]. Aus diesem Untersuchungskollektiv sind 250 Fälle (1,2%) einer definitiven Endokarditis dokumentiert, mit einer In-Haus-Mortalität von 36% und einer 2-Jahres-Sterblichkeit von 66,7% [129]. Die Autoren vermuten eine zweizeitige Infektion (1,5 Monate bis 13,4 Monate; mittleren Zeitabstand von 5,3 Monaten) nach TAVI Implantation im Sinne einer Prothesenendokarditis, ohne einen möglichen Zusammenhang zu einer initialen bakteriellen Infiltration der sVHD-Herzklappen aufzuzeigen [129]. Die nach TAVI Implantation detektierten Prothesenendokarditiden weisen ein Erregerspektrum von *Enterococcus ssp.*, *Staphylococcus aureus*, *Koagulase-negative-Staphylokokken* und *Streptokokken* der Viridansgruppe auf [129-131]. Im historischen Kontext dieser Erkenntnisse ist auffällig, dass bereits verschiedene Arbeitsgruppen 1996, 1998, 2000 und 2002 im Herzklappengewebe von Patienten mit sVHD die typischen aIE Keime mikrobiologisch nachgewiesen und als Kontamination deklariert haben [39-42]. Es kann aber auch vermutet werden, dass die typischen Endokarditis-Keime schon vor einer TAVI-Implantation an der Progression einer verkalkten, stenosierten Herzklappenerkrankung beteiligt sind. In diesen Fällen könnte man annehmen, dass eine offen-chirurgische Intervention mit einer vollständigen Sanierung des strukturell veränderten Gewebes, das Risiko für eine Protheseninfektion verringert. Zusätzlich könnte das exstirpierte Klappengewebe einer mikrobiologischen und molekularbiologischen Analyse zugeführt werden, um ggf. eine individuelle Antibiotikatherapie zu generieren.

### ***Historische Einordnung der eigenen Befunde***

Der Goldstandard zum Nachweis von Bakterien ist seit dem 19. Jahrhundert die Kultivierung von bakteriellen Erregern aus Blut- respektive Gewebeprobe[n] [132, 133]. Diese Nachweismethoden wurden im Laufe des vergangenen Jahrhunderts in vielerlei Hinsicht in ihrer Sensitivität und Spezifität deutlich weiterentwickelt [134]. Die Kultivierung von Herzklappengewebe und der Kulturnachweis von Bakterien im Blut ist

aktuell im klinischen Setting ein Hauptkriterium für die Diagnose einer akut infektiösen Endokarditis [99]. Ungeachtet der Entwicklung von Diagnoseverfahren, gibt es im klinischen Alltag, unterstützt durch wissenschaftliche Arbeiten, bei bis zu 35% der Patienten mit klinischen Zeichen einer Endokarditis keine mikrobiologische Bestätigung auf Bakteriämie in der Blutkultur [135-137]. Die klinische und wissenschaftliche Landschaft verweist eindeutig auf den Nutzen und die Notwendigkeit von mikrobiologischen Untersuchungen des infizierten Herzklappengewebes, insbesondere bei kulturnegativen Endokarditiden [135, 137, 138]. Ungefähr 50% der aIE Patienten werden ausschließlich einer konservativen Therapie mittels Antibiose unterzogen [99]. Die Antibiose zielt auf eine initiale Beeinflussung der Erregerproliferation oder auf ein Abtöten der Bakterien ab [139]. Das Immunsystem des infizierten Organismus muss in der Folge die Erreger eliminieren oder ggf. „einmauern“ [55, 140]. Der Zusammenhang zwischen bakteriellem Nachweis und einer Herzklappenverkalkung ist für eine Vielzahl von Erregern bekannt [17, 38, 141, 142]. Es ist weiterhin vorstellbar, dass eine initiale strukturelle Veränderung der Herzklappe, bspw. durch Störung im Kalziumstoffwechsel [15], sekundär zur Anlagerung von bakteriellen Erregern führen kann und ggf. den Grad der Verkalkung beeinflusst. Trotz dieser Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen bakterieller Infiltration und sVHD gehört der mikrobiologische Kulturnachweis nicht zur klinischen Routine [90]. Bereits Giladi et al. 1996 [42], Chuard et al. 1998 [41] und Campbell et al. 2000 [40] untersuchten in über 600 Herzklappengeweben von Patienten mit struktureller Herzklappenerkrankung durch mikrobiologische Nachweisverfahren eine mögliche bakterielle Infektion respektive Kontamination. Die Studien isolierten aus den Herzklappen in 11%-17% u.a. *Koagulase-negative-Staphylokokken*, *Streptokokken* der *Viridansgruppe*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* und *Enterococcus faecalis* [40-42]. In der Zusammenschau dieser Studien konstatierten jedoch die Autoren, dass es sich um Kontaminationen handelt und nicht um reale Infiltrationen [40-42]. In diesen Studien wurden jedoch keine strukturellen und ultrastrukturellen Untersuchungen zur Validierung der Ergebnisse herangezogen [40-42]. Im Jahr 2002 untersuchte die Arbeitsgruppe um Kolltveit et al. [39] durch zusätzliche elektronenmikroskopische Analysen an Herzklappen von 19 Patienten, ob die mikrobiologisch nachweisbaren Bakterien, isoliert aus den Herzklappengeweben, sich ultrastrukturell, intramural abbilden lassen [39]. Es zeigte sich beispielsweise für *Clostridium spp.* und für *Propionibacterium acnes* eine eindeutige, intramurale Lokalisation von Kolonien [39]. Hiermit wurde erstmalig belegt, dass auch in strukturell erkrankten Herzklappen eine bakterielle Pathogenese möglich ist [39].

Der eigene Forschungsanspruch beschäftigte sich u.a. damit, ein Protokoll zu etablieren, das die morphologischen Veränderungen der Herzklappe von Patienten mit sVHD berücksichtigt und es gestattet, Bakterien aus einem Zellverband von Kollagen, Fibrose und Kalzifikation herauszulösen. Die sVHD-Klappen sind im Wesentlichen durch einen hohen Grad an Verkalkung, Fibrosierung und Kollagengehalt charakterisiert. Mögliche intramural exponierte bakterielle Erreger sind für standard-mikrobielle Aufbereitungsprotokolle nur sehr schwer zugänglich. Im Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurde das Herzklappengewebe nach makroskopischer Beurteilung mechanisch zerkleinert, um die Oberfläche für nachfolgende Aufbereitungsschritte zu erhöhen. Bis zu diesem Punkt der Gewebeaufbereitung entspricht die Vorgehensweise einer klinischen Routine [143]. Eigene histopathologische- und immunhistologische Untersuchungen belegen außerdem eine intramural-lokalisierte Infiltration vereinzelter Bakterien respektive bakterieller Kolonien. Es zeigt sich eine Assoziation der bakteriellen Erreger mit verkalkten und fibrosierten Gewebestrukturen. Daher wurde das Gewebe in einem Medium mit Fildes-Extrakt über mehrere Stunden kultiviert, um, durch enzymatische Aufbereitung von Kollagen und Fibrose, die Bakterien aus einem Zellverband zu lösen. Der dritte Arbeitsschritt des Aufbereitungsprotokolls basiert auf den Erkenntnissen, dass durch eine Ultraschallbehandlung Bakterien aus einem Biofilm separiert werden können [144]. In Herzklappengewebe von Patienten mit sVHD wurden zur Bildung von Biofilmen befähigte Bakterien, wie *Staphylokokken* [145], *Streptokokken* [146], *Enterokokken* [147] sowie *Clostridien* [148], nachgewiesen. Der Biofilm besteht überwiegend aus Bakterien und extrazellulärer Matrix [149]. Ein Auflösen des Biofilms mittels Ultraschall gestattet einen besseren Kontakt zwischen Medium und Bakterium, mit nachfolgender Verbesserung der Proliferation [150, 151]. Die Ultraschallwellen lösen die Erreger aus dem Gewebeverband und überführen die Bakterien in einen planktonischen Zustand, wodurch die Erreger als freie Suspension imponieren [144, 152, 153].

Diese Kombinationsschritte zur Aufbereitung des Herzklappengewebes führten in der eigenen Kohorte von sVHD-Patienten in 5 Fällen zu einem mikrobiologischen Nachweis von *Staphylococcus warneri*, *saccharolyticus* sowie *haemolyticus*, *Enterococcus faecalis* und *Clostridium difficile*. Im Vorfeld der Etablierung dieses erweiterten Aufbereitungsprotokolls erfolgte die Aufbereitung der Herzklappengewebe lediglich mechanisch, gefolgt von einer Inkubation mit Thioglykolat [39]. Die Anwendung dieser Protokollschritte führte jedoch nicht zu einem mikrobiologischen Nachweis von

Bakterien im Gewebe. Der Arbeitsgruppe um Kolltveit et al. (2002) gelang jedoch in Anwendung des vereinfachten Protokolls, nach mechanischer Auftrennung und Überführung in das obengenannte Medium, in 12 von 19 untersuchten Herzklappengeweben ein mikrobiologischer Nachweis für *Neisserien*, *Clostridien*, *Listerien*, *Pantoen*, *Streptokokken*, *Propionibakterien*, *Staphylokokken*, *Streptokokken* und *Acinetobacter* [39].

Prinzipiell belegt diese Untersuchung an 19 Patienten, dass auch Bakterien, die zur Biofilm-Bildung befähigt sind, ohne zusätzliche Ultraschallbehandlung aus dem Herzklappengewebe von Patienten mit sVHD isoliert und angezchtet werden können. Eine mögliche Begründung, weshalb das vereinfachte Protokoll von Kolltveit et al. (2002) [39] in den Geweben der hier untersuchten 100 sVHD- Patienten keinen bakteriellen Nachweis erbrachte, kann durch den Grad der strukturellen Veränderung des Herzklappengewebes begründet sein. Patienten, die einem chirurgischen Herzklappenersatz mit der Grunderkrankung einer sVHD unterliegen, haben prinzipiell eine hohe Varianz für den Grad der Verkalkung, des Kollagengehaltes und der Fibrosierung. Hierdurch wird es deutlich erschwert mit Standardprotokollen einen Zugang zur Bakterienkolonie zu generieren. Es ist auch vorstellbar, dass die präoperative antibiotische Therapie Einfluss auf das ex-vivo-Wachstum von Bakterien nach Klappenexplantation nimmt. In der eigenen Kohorte wurden jedoch lediglich 10% der Patienten präoperativ mit Antibiose vorbehandelt, sodass dies kein hinreichendes Erklärungsmodell für ein vermindertes Wachstum der Bakterien gegenüber der Kohorte von Kolltveit et.al. [39] liefert.

Da die klinische Routine eine standardisierte mikrobiologische Diagnostik von sVHD explantierten Herzklappen nicht vorsieht, lässt die Literatur keine genauen Erklärungsmodelle für die Anzchtbarkeit von Bakterien unter diesen Bedingungen zu. Berücksichtigt man jedoch die Erkenntnisse von Reguiero et al. (2016) [129], dass Patienten nach TAVI-Implantation insbesondere an Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken, im Sinne einer Prothesenendokarditis mit einer hohen Mortalitätsrate, erkranken, dann sollten zukünftige Studien zwingend untersuchen, welche Bakterien mit welchem Nachweisprotokoll aus sVHD-Klappengewebe zum Leben erweckt werden können. Die hier vorliegenden Ergebnisse in Zusammenschau mit der Literatur lassen auch die Hypothese zu, dass durch die TAVI-Implantation das verkalkte Gewebe gesprengt wurde und möglicherweise vorab manifestierte Bakterien zur erneuten Proliferation geführt wurden. Die Pathomechanismen hinter diesen Erklärungsmodellen

werden durch das Vorhandensein von bakteriellen Persister-Zellen noch angefeuert und zu einem späteren Zeitpunkt ausgiebig diskutiert.

Die Wissenschaftslandschaft des nachfolgenden Jahrzehnts wird von molekularbiologischen Analysen des Herzklappengewebes dominiert [17, 37, 38, 154]. Bei genauerer Betrachtung der Literatur kam es durch die Erweiterung des Methodenspektrums via PCR zusätzlich zu einer Hinwendung zu oralpathogenen Bakterien [17, 38]. Es ist nicht hinreichend nachvollziehbar, warum der Generationswechsel des Methodenspektrums hin zu molekularen Nachweisverfahren, die Erkenntnisse von Giladi et al. (1996), Chuard et al. (1998), Campbell et al. (2000) sowie Kolltveit et al. (2002) bis zum heutigen Tag nicht aufgriffen [17, 38, 141, 142].

Die nachfolgenden Studien (2001- 2011) verwenden u.a. eine PCR-Methode, die keine absolute Quantifizierung der DNA-Sequenz gestattet [127, 155]. Erstmals nutzte die Arbeitsgruppe um Oliveira et al. 2015 eine TaqMan-PCR-Methode, um hochspezifisch 16s-DNA der Bakterien im Herzklappengewebe nachzuweisen [17]. Die molekularbiologischen Untersuchungen fokussierten auf oralpathogene Bakterien der Gattung der *Streptokokken* bzw. Parodontitis-assoziierten gram-negativen Bakterien [17].

### ***Epidemiologische Aspekte der infektiösen Herzklappenstenose***

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit adressiert, wie oben genannt, den Zusammenhang zwischen einer subakuten/subklinischen Infektion des Herzklappengewebes und einer Entwicklung chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen, am Beispiel der Aortenklappenstenose. Um einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Infektion als mögliche Ursache einer Kalzifizierung treffen zu können, bedarf es grundsätzlich tierexperimenteller Ansätze [55]. Die Inzidenz einer Assoziation zwischen bakterieller Infektion und der Entwicklung chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen variiert in der Literatur stark zwischen 4% bis 83% [156]. Der Nachweis des Erregerspektrums erfolgte in all diesen Untersuchungen durch immunhistochemische Verfahren [157], ultra-strukturellen Nachweis der Keime im Klappengewebe [154] sowie durch spezifische PCR-Nachweisverfahren [17]. Diese Methoden setzen jedoch explizit Kenntnisse über das nachzuweisende Keimspektrum und dessen Nachweismethoden voraus [158]. In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden die Erkenntnisse und Erfahrungen der Literatur genutzt, um *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Enterococcus faecalis* & *faecium*, *Streptococcus pyogenes* und *agalactiae*, *Clostridium difficile* und

*Klebsiella pneumoniae* nachzuweisen. All diese Bakterien sind signifikant mit einer akuten bzw. chronischen Endokarditis assoziiert [106]. Es ist vorstellbar, dass unter subklinischen Entzündungsprozessen die körpereigenen Abwehrmechanismen ausreichen, um, vermittelt durch Umbauprozesse, dieser Entzündung entgegenzuwirken [159].

Das Patientenkollektiv umfasste 100 Patienten mit sVHD und wurde im Zeitraum von März 2016 bis Juni 2017 monozentrisch rekrutiert. Nach Randomisierung erfolgte die mikrobiologische, histologische und molekularbiologische Untersuchung des Herzklappengewebes. Um die DNA von Bakterienspezies hochspezifisch und sensitiv abbilden zu können, wurden für die o.g. Bakterien jeweils ein spezifisches Primer-Paar und eine spezifische TaqMan-Sonde etabliert. Diese 8 Taq-PCR Analysen wurden als Screening für alle sVHD Patienten angewandt. In 72% der Herzklappengewebeproben konnte ein positiver Nachweis für bakterielle DNA erbracht werden. In 28% zeigte sich eine polymikrobielle Infiltration von 2 und in 3% von 3 Bakterienspezies pro Patient. Die Häufigkeitsverteilung identifiziert das *Cutibacterium acnes* mit 59% als führenden Keim, gefolgt von *Enterococcus faecalis* (16%) und *Staphylococcus aureus* mit 15%. Die Bakterien *Streptococcus agalactiae* und *Klebsiella pneumoniae* konnten nicht in der sVHD Kohorte nachgewiesen werden. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigen sich die Bakterien der physiologischen Haut, Schleimhaut und Darmflora als potente Infektions- und Infiltrationserreger von Herzklappengewebe [106]. Dies ist insbesondere für Patienten mit einer akut-infektiösen Endokarditis beschrieben [160]. Die vorliegenden Daten lassen jedoch vermuten, dass, in einer höheren Anzahl als bisher angenommen, diese Keime auch unter chronischen Infektionsbedingungen Einfluss auf die Klappenmorphologie und somit auf die Hämodynamik nehmen. Die präoperativen Untersuchungen geben nur bedingt Hinweise auf eine akute bzw. subakute Infektion oder Inflammation. Lediglich die Surrogat-Marker der Entzündung, IL-6 (18,97 pg/ml  $\pm$  76,68 pg/ml) und das C-reaktive-Protein (11,65 mg/dl  $\pm$  32,11 mg/dl), sind über der Norm erhöht, ohne klinische Zeichen einer Infektion. Wenn man diese Akut-Phase-Proteine zur Erklärung der bakteriellen Infiltration in die Herzklappen einbezieht, lässt sich nur eine Disposition für eine Infektion ableiten.

Die chronisch strukturelle Herzklappenerkrankung manifestiert sich über mehrere Jahre [6] bis zur klinischen Relevanz (Aortenklappe: KÖF<1; Gradienten Mean >40mmHg) und somit sind akute Entzündungsprozesse nicht hinreichend als Erklärungsmodell für bakterielle Infiltration ausreichend. Dennoch legen die vorliegenden Befunde der

Bakterien *Streptococcus* und *Staphylococcus* sowie *Enterococcus* eine Beteiligung der gestörten Haut- und Schleimhautbarriere [161] an der Pathogenese der sVHD nahe. Voroperationen am Herzen können auch eine Infiltration des Herzklappengewebes mit Bakterien verursachen [162]. Insbesondere Herzklappenprothesen oder Herzschrittmacherimplantationen sind mit einem signifikant erhöhten Risiko für eine akut infektiöse Endokarditis vergesellschaftet [163, 164]

Legt man den Nachweis bakterieller DNA durch die Amplifizierung der konservierten bakteriellen 16Sr-DNA zu Grunde, dann zeigten in entsprechenden Voruntersuchungen 100% aller in der vorliegenden Studie eingeschlossenen 100 Patienten mit sVHD einen positiven Nachweis für bakterielles Genom im Herzklappengewebe. Es stellt sich die Frage, ob die Methode der 16Sr-DNA-Analyse zu sensitiv oder hinreichend valide für den Nachweis bakteriellen Genoms im Herzklappengewebe ist. Wissenschaftliche Untersuchungen von Nakano et al. (2009) diskutieren, dass in 80% der Herzklappen und in 90% von aortalen Geweben mindestens ein oralpathogenes Bakterium der Gattung der Streptokokken bzw. Parodontitis-assoziierten gram-negativen Bakterien mittels spezifischer PCR-Methode nachweisbar sind [38]. Die Literatur beschreibt auch die Prävalenz und Assoziation der Gattungen Mykoplasma [37], der gram-negativen Acinetobacter [39] und der Propionibakterien [165] mit einer kalzifizierten Herzklappe. Es zeigt sich, dass die Verwendung der 16srDNA-PCR für ein Screening im klinischen Setting zur Diskriminierung von Infizierten und nicht-infizierten Herzklappengewebe ungeeignet ist. Vorteilhafter scheint die Etablierung spezieller PCR-Sonden zur Abbildung von Bakteriämien [166].

Durch konsequente Diagnostik der Herzklappengewebe mittels Taq-PCR für *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Enterococcus faecalis & faecium*, *Streptococcus pyogenes und agalactiae*, *Clostridium difficile* und *Klebsiella pneumoniae* konnten detaillierte Ergebnisse und damit die Prävalenz der bakteriellen Infiltration im Zusammenhang mit der klinischen Charakterisierung gewonnen werden. Die vorliegende Untersuchungskohorte, mit einem positiven Nachweis für eine bakterielle Infiltration in 72%, hatte in 4,1% der Fälle eine Mitralklappenrekonstruktion, einen Aortenklappenersatz (2,8%) oder eine Schrittmacherimplantation (1,4%). Diese Eingriffe fanden zwischen 1 und 21 Jahren vor dem aktuellen Herzklappenersatz statt. In solchen Fällen ist es durchaus nachvollziehbar, dass es über mehrere Jahre zu rezidivierenden subklinischen Infektionen mit nachfolgenden chronischen Umbauprozessen kommen kann.

Bemerkenswert ist die Erkenntnis, dass eine erhöhte Prävalenz der Herzklappensklerose mit 25% im Alter über 65 Jahre nachgewiesen wird [6]. Die in der vorliegenden Studie untersuchte Kohorte hatte ein Durchschnittsalter von 67 Jahren mit einer Spanne von 55 Jahren bis 75 Jahren. Eine klinisch relevante Herzklappenstenose mit einer KÖF < 1,0 cm und/oder einem Druckgradienten im Mittel über 40 mmHg haben jedoch im Alter von 65 Jahren lediglich 2-7% [90]. Epidemiologische Studien zeigen, dass 65% der über 65-jährigen an einer Divertikulose leiden und wiederum 10%-25% eine Divertikulitis entwickeln [167]. Sowohl die Divertikulose als auch die Divertikulitis sind mit der Entwicklung einer Bakteriämie vergesellschaftet [168, 169]. Die Bakteriämie im Alter ist auch mit häufigeren Infektionen des Urogenital- und Oropharyngealtrakts assoziiert [170]. Eine bedeutende Rolle in der Prävalenz einer Bakteriämie wird dem Keimspektrum des Mund-Rachenraums zugeschrieben [38, 171]. Insbesondere die klinische Bedeutung der gram<sup>+</sup>/oral Streptokokken und der gram<sup>-</sup>/Parodontitis assoziierten Bakterien für die akuten und chronischen Infektionsprozesse des Herz-Kreislaufsystems sind nachhaltig belegt [52]. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass die tägliche Zahn- und Mundhygiene mittels Zähneputzen in 0% bis 26%, das Verwenden von Zahnseide in 20% bis 58% oder gar das normale Kauen in 17%-51% mit einer Bakteriämie einhergeht [38, 172].

Wenn man annimmt, dass die beginnende Sklerosierung der Herzklappe durch chronische Entzündungsprozesse respektive Bakteriämien gefördert werden, dann stehen Patienten mit chronischen Infektionsprozessen unter erhöhtem Risiko eine klinisch-relevante Herzklappenstenose zu generieren. Berücksichtigt man jedoch die Prävalenz der chronischen Darmentzündungen sowie Erkrankungen der Organstrukturen mit einer Barrierefunktion (Schleimhaut) oder die Bakteriämie nach Mund-Rachenhygiene, dann müssten signifikant mehr klinisch relevante Herzklappenstenosen zu verzeichnen sein, als 3-7% bei >65-jährigen. Die Sklerosierung der Herzklappen ist jedoch signifikant mit dem Alter korreliert [1]. Patienten im Alter von 85 Jahren weisen in >50% der Fälle eine relevante Sklerosierung der Herzklappen auf [6]. Diese Patientenkohorte wird nach aktueller ESC-Guideline [90] und individuellem Risikoprofil jedoch mit einer TAVI versorgt [173]. In diesen Fällen ist ein Nachweis von bakteriellen Infiltrationen im Klappengewebe nicht möglich, da das verkalkte Klappengerüst als Rahmen für das Prothesenimplantat dient und nicht, wie bei konventionellem Herzklappenersatz, entfernt wird [174].

Es bleibt zu vermuten, dass chronische Infektionen mit Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken einen Einfluss auf die Prävalenz und Progredienz der Herzklappenstenosen ausüben, welcher weit über den aktuellen Kenntnisstand hinaus reicht. Die Einbindung sensitiver und spezifischer Nachweismethoden für eine bakterielle Infiltration ins Herzklappengewebe in den klinischen Routine-Diagnostikprozess, gepaart mit der detaillierten Erhebung chronischer Infektionserkrankungen, kann in zukünftigen Forschungsansätzen das Risikoprofil für die Entwicklung einer Herzklappensklerose abbilden.

Weiterführende Ursachen für die Verkalkung der Klappengewebe sind Störungen im Kalziumstoffwechsel [34], Mikroläsionen des Herzklappenendothels [23], die Expression eines pathologischen Lipidstoffwechsels [31] sowie eine autoimmunbedingte Schädigung des Klappengewebes im Rahmen eines Rheumatischen Fiebers [175].

### ***Histopathologische Beurteilung der sVHD-Herzklappengewebe***

Insbesondere die inflammatorischen Prozesse im Herzklappengewebe, führen durch Stimulation der interstitiellen Zellen zu phänotypischen Umbauprozessen [2]. Hierbei entstehen Zelltypen mit osteoplastischen Eigenschaften, die eine Mineralisation des Herzklappengewebes triggern [25]. Im vergangenen Jahrzehnt vertieften histopathologische- und ultrastrukturelle Untersuchungen des Herzklappengewebes die Hypothese, dass es sich in einem Großteil der Erkrankungen um eine Progression aktiv-entzündlicher Prozesse handelt [14, 176]. Unklar ist jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt, ob bakterielle Erreger diese Prozesse nachhaltig fördern.

Chronisch strukturell veränderte und präoperativ als nicht infektiös eingestufte Herzklappen werden nur sehr selten routinemäßig histopathologisch untersucht. Lediglich bei intraoperativ auffälliger Morphologie entscheiden sich die Operateure das Gewebe an das Pathologische Institut zu schicken. Dort werden lediglich die 3 Standardfärbungen HE-, Elastica van Gieson- und PAS-Färbung angewandt und die Präparate mikroskopisch untersucht, wodurch nur eine recht allgemein gehaltene Beschreibung der Klappenstruktur möglich ist. Spezialfärbungen wie z.B. immunhistochemische Antikörper-Färbung für die spezifische Darstellung von Bakterien im Herzklappengewebe kommen nicht standardmäßig in der Diagnostik der sVHD zur Anwendung. Da intraoperativ, wie oben erwähnt, manchmal Ähnlichkeiten zwischen der makroskopischen Morphologie verkalkter sVHD-Klappen und akut infizierter Herzklappen festgestellt werden und die klare Unterscheidung zwischen infektiös und nicht-infektiös nicht immer möglich ist, wäre es wünschenswert, dass eindeutige

histopathologische Kriterien für die Diagnose einer akut infektiösen Endokarditis herangezogen werden könnten. Allerdings stehen, wie Lepidi et al. 2006 in ihrer Publikation berichten [177], bei Fehlen eines histopathologischen Erregernachweises keine eindeutigen, sorgfältig definierten Kriterien auf qualitativer oder quantitativer Ebene für die Diagnose „Aktive Endokarditis“ zur Verfügung. Es existieren zwar die historischen von Reyn-Kriterien [122] sowie die neueren, modifizierten Duke-Kriterien [114], die beide die histopathologische Untersuchung in ihre Diagnosekriterien integrieren, jedoch ist laut diesen Kriterien, bei histopathologisch nicht-nachweisbarem Erreger, der Nachweis eines Entzündungsinfiltrats ausreichend für die Diagnose einer aktiven Endokarditis [124, 177]. Dies kann bei der Abgrenzung einer akuten Infektion zu einer chronischen Inflammation im Rahmen von chronisch strukturellen Herzklappenerkrankungen, in denen ebenfalls ein Entzündungszellinfiltrat nachweisbar ist [24, 25], durchaus Schwierigkeiten bereiten [177].

Zudem ist zu sagen, dass in der durchgeführten Spezialdiagnostik über spezielle immunhistochemische Färbungen in klinisch sowie histopathologisch als sVHD klassifiziertem Klappengewebe bakterielle Erreger nachgewiesen werden konnten. Dies spricht sehr dafür, Spezialuntersuchungen auch an Herzklappen durchzuführen, die primär als nicht-infektiös eingestuft wurden und zukünftig auch chronisch strukturell veränderte Herzklappen großzügiger auf bakterielle Erreger zu untersuchen.

In Zusammenschau obengenannter Erkenntnisse ist es durchaus vorstellbar, dass typische bakterielle Erreger einer akut infektiösen Endokarditis auch an subklinischen Umbauprozessen von Herzklappen beteiligt sind. In diesen Fällen sollten Spuren bakterieller DNA in Herzklappengeweben von Patienten mit chronisch strukturellen Herzklappenerkrankungen nachweisbar sein. Hierfür bedarf es hoch sensitiver und gleichzeitig spezifischer Nachweismethoden [111]. In der vorliegenden Untersuchung erfolgte der quantitative Nachweis der jeweiligen bakteriellen DNA mittels Taq-PCR. Zur Interpretation der quantitativen Expressionsdaten wurde das Herzklappengewebe einer Kohorte von Patienten mit klinisch nachgewiesener akut infektiöser Endokarditis gewählt. Das negative Kontrollgewebe entstammt von Herzklappen aus Patienten nach Transplantation oder Aortenprothesenimplantation mit Aortenklappenersatz. In allen Herzklappengeweben der Kontrollpatienten konnte histopathologisch und klinisch eine Infektion ausgeschlossen werden.

Obwohl über die obengenannten sensitiven PCR-Methoden nun auch kultur-unabhängige Verfahren für den Nachweis zahlreicher Bakterien, Viren oder auch Pilze zur Verfügung stehen [178], sind die verwendeten molekularbiologischen Verfahren nur in der Lage genetisches Material bakterieller Erreger nachzuweisen [179]. Eine Aussage über die Vitalität der gefundenen Erreger ist über die konventionelle Realtime-PCR jedoch nicht möglich [180]. Der Nachweis bakterieller DNA in chronisch strukturell verändertem Herzklappengewebe zeigt demnach lediglich den Kontakt von bakteriellen Erregern mit dem Klappengewebe, er lässt jedoch keine Aussage über die Rolle der Erreger in der Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen zu. Um die mögliche Rolle bakterieller Erreger in der Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen nachvollziehen zu können, ist eine genaue Kenntnis über die Lebensweisen und Virulenzfaktoren der nachgewiesenen Erreger nötig.

#### ***Rolle spezifischer aIE assoziierter Bakterien in der Pathogenese der sVHD***

In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit liegt das Interesse v.a. auf dem spezifischen Nachweis von Endokarditis-assoziierten Bakterien in chronisch strukturell veränderten Herzklappen. Hierfür erfolgte eine spezifische TaqMan-PCR-Analyse für folgende 8 Keime: *Streptococcus pyogenes*, *Cutibacterium acnes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus agalactiae* und *Klebsiella pneumoniae*. Anhand der gesammelten Daten und der detaillierten Beurteilung der Pathogenitätsfaktoren dieser Bakterien ergeben sich 2 mögliche Mechanismen der Beteiligung bakterieller Erreger an der Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen (sVHD). Zum einen ist eine direkte Schädigung des Herzklappengewebe über verschiedenste Pathogenitätsfaktoren der beteiligten Bakterien möglich. Die ausgelöste subklinische, nicht symptomatische Infektion führt möglicherweise über körpereigene Abwehrmechanismen, kombiniert mit speziellen Virulenzfaktoren der Bakterien, beispielsweise der Fähigkeit zur Kalzifikation, zur Einmauerung der Bakterien im Klappengewebe und strukturellen Veränderung der Herzklappe. Als zweiter Mechanismus ist eine sekundäre Ablagerung der Bakterien auf einer bereits vorgeschädigten Herzklappe denkbar. Über rezidivierende subklinische Bakteriämien lagern sich Bakterien, beispielsweise aus dem Mund-Rachen-Raum oder dem Gastrointestinaltrakt auf einem bereits bestehenden Endothelschaden der Herzklappe ab und triggern dadurch eine lokale Entzündungsreaktion und darauffolgend chronische Umbauprozesse des Klappengewebes.

### *Streptococcus pyogenes*

In 10% der untersuchten chronisch strukturell veränderten Herzklappen konnte das Genom von *Streptococcus pyogenes* über die TaqMan-PCR im Herzklappengewebe nachgewiesen werden. Die Verteilungsbreite der DNA-Konzentration reicht von  $10^1$  pg/ml bis zu  $10^4$  pg/ml. Die Pathologie der chronisch-strukturellen Herzklappenerkrankungen umfasst, wie auch in unseren histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen bestätigt, den Zustand der Fibrosierung bis hin zur Verkalkung [1]. Sieben der zehn *Streptococcus pyogenes*-positiven sVHD-Klappen wiesen eine schwere, hochgradige Aortenklappenstenose mit deutlicher bis massiver Verkalkung auf.

Die Literatur beschreibt den Ausprägungsgrad der Klappenzerstörung als ein Produkt jahrzehntelanger Veränderungen, bis sie letztlich klinisch relevante Stenosen ergeben [181]. Es ist vorstellbar, dass rezidivierende unterschwellige Herzklappeninfektionen durch das Immunsystem zielgerichtet bekämpft werden können, ohne dass sich der Zustand einer akuten Endokarditis manifestiert. Dies würde für geringe Konzentrationen an *Streptococcus pyogenes*-DNA im Klappengewebe sprechen.

Höhere Konzentrationen, wie in 2 Patienten beobachtet ( $>10^2$  pg/ml), lassen eine subklinische Endokarditis als Ursache der Infektion vermuten. Dieser Gedanke wird umso wahrscheinlicher, wenn man berücksichtigt, dass die nachgewiesenen Herzklappen-DNA-Konzentrationen von 2 Patienten vergleichbar mit einem Patienten mit aIE sind (siehe Grafik 22). Die histopathologische Diagnostik zeigt jedoch signifikante Unterschiede in der Erregerverteilung innerhalb des Klappengewebes im Vergleich der sVHD versus aIE (siehe Grafik 19).

Bakterielle Erreger wie *Streptococcus pyogenes* können auf mehreren Wegen Herzklappengewebe nachhaltig schädigen [182, 183]. Dies gelingt zum einen durch direkte Mechanismen und Virulenzpotenzial des Erregers [182], als auch mittelbar über die Initiierung von Autoimmunprozessen [175]. Zu den direkten pathogenen Mechanismen des *Streptococcus pyogenes* zählen, bei Präsenz von spezifischen M-Protein-Serotypen, die Invasion von Haut, Schleimhäuten und Weichteilen und die direkte Schädigung und Entzündung des Gewebes [182].

Vorstellbar wäre, dass eine akute Infektion mit *Streptococcus pyogenes*, im Sinne einer akut infektiösen Endokarditis, eine Schädigung der Herzklappe bedingt und über

langfristige Heilungsprozesse zu einer Fibrosierung und Kalzifizierung der Herzklappen führt.

Es zeigt sich jedoch, dass *Streptococcus pyogenes* nicht zu den häufigen Keimen der akut infektiösen Endokarditis zählt und in den wenigen veröffentlichten Fallserien gar als sehr seltener Erreger einer akuten Herzklappeninfektion bezeichnet wird [184-186].

Auf diesen Gedanken folgend müssten wohl chronische Umbauprozesse, die nicht primär auf eine akut bakterielle Endokarditis zurückzuführen sind, für den häufigen Nachweis von *Streptococcus pyogenes* in der qPCR in chronisch strukturell veränderten Herzklappen verantwortlich sein. Dafür müssen mögliche Strategien und Mechanismen des Erregers näher betrachtet werden.

*Streptococcus pyogenes* gehört zu den  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe A und gilt als wesentlicher Auslöser des rheumatischen Fiebers [187]. Das rheumatische Fieber verursacht neben Pathologien in Gelenken, Gehirn und Haut auch strukturelle Veränderungen im Endokard, meistens in Form einer Mitralklappenstenose, seltener auch Aortenklappenstenose [175]. Dabei schädigt der bakterielle Erreger die Organe nicht direkt, sondern löst Tage bis Wochen nach einer akuten bakteriellen Infektion über ein sogenanntes molekulares Mimikry eine autoimmunbedingte Schädigung des Gewebes aus [188]. Beim molekularen Mimikry werden autoreaktive T-Lymphozyten über Epitope mikrobieller Antigene, im Rahmen bakterieller Infektionen, aktiviert und gegen körpereigene Strukturen gerichtet [189].

Gruppe-A-Streptokokken besitzen eine Zellwand aus N-acetyl- $\beta$ -D-Glukosamin verbunden mit einem Rhamnose-Rückgrat und sogenannten M-, T- und R-Oberflächen-Proteinen sowie Lipoteichonsäuren [190]. Das M-Protein stellt die wichtigste Antigen-Struktur des Bakteriums dar und weist strukturelle Ähnlichkeiten zu humanen Proteinen wie dem kardialen Myosin, Tropomyosin, Keratin, Laminin, Vimentin und anderen endothelialen Proteinen auf [182].

In einer wissenschaftlichen Arbeit von Guilherme et al. 1995 konnten drei immundominante Regionen auf dem M5-Protein in *Streptococcus pyogenes* identifiziert werden, welche in der Lage sind, mit Proteinbestandteilen aus Herzklappengewebe eine Kreuzreaktion über eine Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen auszulösen [191]. Eine Kreuzreaktion beschreibt die Bindung eines Antikörpers an zwei verschiedene Antigene, die allerdings Epitope aufweisen, die identisch sind oder sich sehr ähnlich sehen, wodurch der Antikörper nicht in der Lage ist die beiden Antigene zu unterscheiden [192].

So werden mikrobielle Proteine wie das M5-Protein in genetisch prädisponierten Personen von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten erkannt, wodurch eine Autoimmunreaktion mit

Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, IL-4, u.a. im kardialen Gewebe induziert wird [190, 193]. Die kreuzreaktiven Antikörper sind in der Lage an das Endothel zu binden und Entzündungszellen anzulocken, welche sich im Gewebe ablagern und eine Entzündung und Schädigung des Klappengewebes auslösen [188]. Bei den endokardialen Ablagerungen im Rahmen eines Rheumatischen Fiebers handelt es sich um abakterielle Vegetationen, bestehend aus einem Ödem und mononukleären Entzündungszellinfiltrat sowie bei länger dauernder Erkrankung einer Fibrosierung und Verkalkung der Vegetation [183]

Prinzipiell kann ein Rheumatisches Fieber in jedem Alter auftreten, das typische Erkrankungsalter liegt allerdings im Kindes- und Jugendalter [194]. Die typische rheumatisch bedingte Herzklappenerkrankung entwickelt sich über einige Jahre bis hin zur symptomatischen Herzklappenstenose im mittleren Lebensalter [195]. Da in der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit der Altersdurchschnitt bei 67 Jahren lag, erscheinen Herzklappenveränderungen, ausgelöst durch ein Rheumatisches Fieber im Kindesalter, als Erklärung für den häufigen Nachweis von *Streptococcus pyogenes* in den untersuchten strukturell veränderten Herzklappen eher unwahrscheinlich. Wobei gesagt werden muss, dass der alleinige Nachweis von *Streptococcus pyogenes* in sVHD-Klappen mit einem signifikant niedrigeren Altersdurchschnitt (58 Jahre) einherging als bei den Patienten mit polymikrobiellen Infiltration, d.h. einer CO-Infiltration mit anderen Erregern.

Doch möglicherweise spielt die Tatsache eine Rolle, dass eine Sklerose der Aortenklappe, als Vorstufe der Aortenklappenstenose, in 25% der über 65-jährigen und sogar in 50% der über 85-Jährigen Europäer zu finden ist [5, 6], jedoch schlussendlich nur ein kleiner Teil davon, ca 2-7% der über 65-Jährigen, eine symptomatische Aortenklappenstenose entwickelt [90]. So könnte es doch sein, dass die sehr häufige Sklerosierung des Klappengewebes als idealer Angriffspunkt für bakterielle Erreger fungiert und *Streptococcus pyogenes* sich im Rahmen von subklinischen Bakteriämien an der Klappe anlagern kann und über die Induktion des zuvor genannten Autoimmunprozesses auch im Alter noch eine Progression zu einer symptomatischen Stenose der Klappe verursachen kann. Dafür spricht auch die Tatsache, dass sich Erreger nach inapparenten Infektionen mit A-Streptokokken noch monatelang im Oropharyngealraum nachweisen lassen und sich ein Trägerstatus des Patienten ausbilden kann [196]. So könnte es vielleicht genau bei diesen Patienten mit asymptomatischer retropharyngealer Besiedlung mit *Streptococcus pyogenes*, beispielsweise im Rahmen von Zahneingriffen, zu einer Bakteriämie und konsekutiv zu einer Ablagerung der Streptokokken in einer bereits

sklerosierten Herzklappe kommen. Möglicherweise könnte bei genau jenen Patienten mit bestehender Klappensklerose durch eine prophylaktische Antibiotikagabe, im Rahmen von Eingriffen im Mund-Rachen-Raum, eine Besiedlung der Herzklappe mit *Streptococcus pyogenes* und damit vielleicht die Progression zur symptomatischen Stenose verhindert werden.

Klar ist, dass weitere retrospektive Studienansätze notwendig sind, um diesen Zusammenhang zwischen rezidivierenden oropharyngealen Infektionen durch *Streptococcus pyogenes* und der progressiven Entwicklung von einer Sklerose zu einer hämodynamisch relevanten Aortenklappenstenose zu klären.

Doch ist *Streptococcus pyogenes* auch in der Lage direkt einen entzündlichen Prozess am Herzklappengewebe zu triggern, sich im Gewebe abzulagern und damit eine Kalzifikation und Entstehung einer chronisch strukturellen Herzklappenerkrankung zu bedingen?

Streptokokken wie *Streptococcus salivarius* oder *Streptococcus tigurinus* sind als Endokarditis- und Karies-Erreger bekannt und in der Lage, u.a. über eine pH-Erhöhung im Gewebe, Verkalkungen zu produzieren [56, 58]. *Streptococcus pyogenes* ist eher als Auslöser invasiver Weichteilinfektionen, akuter Tonsillitiden und des Rheumatischen Fiebers gefürchtet und nicht so sehr als typischer Endokarditis-Erreger oder Auslöser von Gewebe-Verkalkungen [182]. Einzelne ältere wissenschaftliche Arbeiten berichten über die Sklerosierung von Gewebe [197, 198] wie beispielsweise einer Sklerosierung des Mittelohrs, bedingt durch eine Infektion mit *Streptococcus pyogenes*, wobei die Pathogenese dieser Veränderung noch nicht genau geklärt werden konnte [197].

Wie oben erwähnt entstehen im Rahmen des Rheumatischen Fiebers histopathologisch sterile Vegetationen und Verkalkungen im Herzklappengewebe, die nach aktuellen Erkenntnissen auf eine chronische Inflammation im Gewebe zurückgeführt werden [193] und nicht, wie früher angenommen, über einen passiven Prozess der Degeneration entstehen [199].

In den meisten wissenschaftlichen Arbeiten wird davon ausgegangen, dass die Herzklappenschädigung allein durch die autoimmunbedingte Entzündungsreaktion getriggert wird und der bakterielle Erreger selbst keine direkte Schädigung verursacht oder sich gar im Klappengewebe einlagert [182, 183, 189]. Aktuelle Studien von Figueroa et al. 2007 sowie von Bayram et al. 2011 zeigen allerdings, dass Herzklappenveränderungen im Rahmen des Rheumatischen Fiebers nicht nur auf den genannten Autoimmunprozess zurückzuführen sind, sondern bakterielle Erreger möglicherweise auch direkt eine Rolle in der Pathogenese spielen [37, 200]. In den beiden

genannten Studien (Figuroa 2007, Bayram 2011) konnte bakterielle DNA im Klappengewebe der untersuchten rheumatisch bedingt stenosierte Mitralklappen über PCR nachgewiesen werden [37, 200]. *Streptococcus pyogenes* scheint also über unterschiedliche Mechanismen in der Lage zu sein Herzklappengewebe zu schädigen und somit möglicherweise die Pathogenese von chronisch strukturell veränderten, nicht akut infektiösen Herzklappen zu beeinflussen.

#### *Cutibacterium acnes*

Das Erregerspektrum einer sVHD-assoziierten Infiltration umfasst in der vorliegenden Studie auch den Nachweis des *Cutibacterium acnes*. Das *Cutibacterium acnes* ist ein Gram-positives Bakterium und ein wichtiger Bestandteil der physiologischen Mund- und Hautflora. Lange Zeit wurde der Nachweis von *Cutibacterium acnes* beispielsweise in Blutkulturen als Kontamination eingestuft, da der Erreger als physiologischer Bewohner der Hautflora, als nur niedrig virulent eingestuft wird [201]. Seine Virulenz ist prioritär mit entzündlichen Hautveränderungen wie der Akne vulgaris assoziiert [202]. Die Nomenklatur des *Cutibacterium acnes* wurde 2016 von *Propionibacterium acnes* zu *Cutibacterium* umbenannt [203].

In der vorliegenden sVHD-Kohorte konnte der Erreger in 59 von 100 Herzklappen durch Taq-PCR quantifiziert werden. Im direkten Vergleich zeigte sich im Herzklappengewebe von Patienten mit einer aIE in 60% der Fälle ein positiver Taq-PCR-Befund mit *Cutibacterium acnes*.

Das *Cutibacterium acnes* ist ein typischer Keim der Hautflora [201] und somit ist es vorstellbar, dass es sich um eine Kontamination der Proben, entweder durch den Untersucher (resp. Untersuchungsprozess) oder des Patientengewebes, handelt. Wenn der Diagnostikprozess für die Kontamination verantwortlich wäre, würde man zeitgleich mit einem hohen Grad an Korrelation andere Hautkeime nachweisen können. Dies ist in der vorliegenden Untersuchung nicht der Fall. Eine andere Erklärung für die hohe Durchseuchungsrate der Herzklappen beruht auf einer möglichen rezidivierenden Koinfektion mit *Cutibacterium acnes*. Die Literatur des vergangenen Jahrzehnts diskutiert den molekularbiologischen und mikrobiologischen Nachweis häufig als Kontamination [201]. Ein direkter pathophysiologischer Zusammenhang wurde bis dato im Tiermodell nicht geführt. Um dennoch den tatsächlichen Zusammenhang zwischen einem DNA-Nachweis und einer lokalen Infiltration belegen zu können, wurde das Herzklappengewebe in der vorliegenden Studie zusätzlich histopathologisch durch immunhistochemische Verfahren mittels konfokaler Mikroskopie beurteilt.

Es zeigte sich eine echte intramurale Besiedlung und ubiquitäre Verteilung des Erregers im Klappengewebe sowohl von sVHD- als auch von aIE-Patienten. Der Unterschied zwischen der *Cutibacterium-acnes*-assoziierten Pathogenese der sVHD und aIE zeigte sich jedoch schon auf struktureller respektive morphologischer Ebene im Herzklappengewebe. In den Herzklappen von sVHD Patienten ist das *Cutibacterium acnes* tief strukturell im fibrotischen bzw. verkalkten Klappengewebe eingebettet. Im Gegensatz dazu zeigen akut infektiöse Herzklappen ein dichtes Entzündungszellinfiltrat mit einer Ko-Lokalisation des bakteriellen Erregers mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Außerdem sind die Cutibacterien im aIE-Herzklappengewebe nicht in eine dicke Kalkschicht eingebettet, sondern infiltrieren die aufliegenden Vegetationen.

Die Beurteilung der histopathologischen Unterschiede lässt vermuten, dass *Cutibacterium acnes* sowohl akut infektiöse Herzklappenerkrankung als auch chronische Veränderungen am Herzklappengewebe verursacht bzw. beeinflusst.

So scheint das *Cutibacterium acnes* in den sVHD-Klappen möglicherweise schon längere Zeit in den Kalkschichten zu schlummern, wohingegen sich die Erreger in akut infektiösem Gewebe eher akut in thrombotischen Auflagerungen präsentieren.

Es ist weiterhin bekannt, dass das Bakterium auch als opportunistischer Erreger insbesondere bei immungeschwächten Patienten den Ausprägungsgrad einer Infektion protrahiert [202, 204]. Zusätzlich löst er eine Reihe von postoperativen oder Fremdkörper-assoziierten Infektionen aus, die sich neben Infektionen von Gelenken, Knochen, Mund, oder Gehirn auch als Infektionen von prothetischen Materialien wie Herzklappen oder Endoprothesen äußern [202, 204].

Es existieren eine Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten und Fallserien über *Cutibacterium*-bedingte infektiöse Endokarditiden, die häufig mit einem komplikationsreichen Verlauf vergesellschaftet sind [204-206]. Dabei spielen die Virulenzfaktoren der unterschiedlichen *Cutibacterium acnes*-Stämme eine wesentliche Rolle. So führt beispielsweise die Fähigkeit der Gewebeadhäsion mit konsekutiver Aktivierung einer Entzündungsreaktion im infiltrierten Gewebe zu einer Aktivierung des Abwehrsystems mit letztlich morphologischen Umbauprozessen [201].

Die Kenntnisse über die Fähigkeit von *Cutibacterium acnes* eine akut infektiöse Herzklappenerkrankung auszulösen und zeitgleich ein Erreger der Standardhautflora zu sein, stützt die Hypothese, dass das Bakterium wesentlich an der Entstehung von chronisch strukturellen Herzklappenerkrankungen beteiligt sein kann.

Der Zusammenhang zwischen subakuter Endokarditis und sVHD wurde unlängst in mehreren wissenschaftlichen Abhandlungen beschrieben [51, 54, 141]. Aber auch subklinische, rezidivierende und unterschwellige Entzündungsreaktionen der Herzklappen durch *Cutibacterium acnes* können den Prozess der Fibrosierung und Kalzifizierung im Herzklappengewebe fördern und somit einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung von Klappenvitien leisten.

Folgt man der Literatur, zeichnet sich trotz der ubiquitären Hautbesiedlung von *Cutibacterium acnes* ein eher seltenes Bild einer manifesten aIE ab [207]. Unstrittig ist jedoch, dass DNA-Analysen mittels PCR ein sehr sensitives Verfahren zum Erregernachweis darstellen [111]. Die Erkenntnisse über die Infektionsrate von Herzklappengewebe mit *Cutibacterium acnes* basieren jedoch auf mikrobiologischen Blutkultur- oder Klappenkulturuntersuchungen [206].

In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass *Cutibacterium acnes* ein sehr langsam wachsendes Bakterium mit einer Bebrütungszeit von ca. 14 Tagen ist. Folglich ist bei einer bei Verdacht auf eine aIE standardmäßigen Inkubationszeit von 4-5 Tagen von einem möglicherweise häufigen fälschlichen Übersehen in der Diagnostik auszugehen [206].

Weiterführende Untersuchungen müssen den Zusammenhang zwischen der *Cutibacterium acnes*-Virulenz, Herzklappendestruktion und/oder ggf. dessen Potenz als Bakterium bei Polymikrobieller Infektion aufklären. Die Häufigkeit des Nachweises der *Cutibacterium acnes*-DNA im Herzklappengewebe lässt zwar keine direkte Ableitung für dessen ursächlichen Beitrag in der Klappendegeneration erkennen, legt jedoch die These einer essentiellen Beteiligung an chronischen Veränderungen des Herzklappengewebes nahe.

Eine Studie von Tyner et.al. 2016 berichtet über eine häufige Co-Infektion von *Cutibacterium acnes* mit *Staphylococcus aureus* und *epidermidis*, da die beiden Erreger zusammen in der Lage sind stabilere und dichtere Biofilme zu generieren als ein einzelnes Bakterium [149]. In 22% der in der vorliegenden Studie mit *Cutibacterium acnes* infiltrierte Herzklappen finden sich auch Co-Infiltrationen mit *Staphylococcus aureus*. Dies lässt vermuten, dass die durch Co-Infektion mit beiden Erregern bedingte Ausprägung des Biofilms auf dem Klappengewebe die Pathogenese wesentlich beeinflussen kann. Untersuchungen zu diesen möglichen kausalen Pathomechanismen stehen jedoch noch aus.

Die bakterielle Fähigkeit zur Biofilm-Bildung stellt einen wichtigen Pathogenitätsfaktor in zahlreichen chronisch rezidivierenden Infektionen, beispielsweise im Nasen-Rachenraum, dar [208]. Biofilme sind in der Lage eine anhaltende Entzündungsreaktion des Immunsystems auszulösen, gleichzeitig über ihre Struktur die bakteriellen Erreger vor dieser Immunreaktion zu schützen [209]. Es bleibt allerdings unklar, ob die Bakterien im Biofilm selbst in der Lage sind eine Gewebeschädigung zu verursachen oder ob die induzierte Entzündungsreaktion das infizierte Gewebe sekundär schädigt [209]. Wie in der Einleitung dargestellt, finden sich in solchen Biofilm-Formationen häufig bakterielle Persister-Zellen [76]. Diese Persister-Zellen sind in der Lage, nach einer transienten Stressphase, z.B. einer Antibiotikatherapie, den Biofilm neu zu besiedeln und periodisch einzelne Bakterien in eine planktonische Form zu entlassen, wodurch eine erneute Entzündungsreaktion induziert werden kann [210]. *Cutibacterium acnes* ist, neben der Fähigkeit zur Biofilm-Bildung (Jahns et al. 2016), ebenfalls in der Lage bakterielle Persister-Zellen zu generieren und so in einer stationären „Schlaf-Phase“ im Gewebe zu persistieren [211].

In der Literatur existieren einige Berichte über subklinische Infektionen, ausgelöst durch *Cutibacterium acnes* [212, 213]. So berichten Yamamoto et al. 2017 von einem asymptomatischen Patienten mit echokardiographischem Zufallsbefund einer endokarditischen Klappenvegetation, die nach operativer Entfernung eine positive Kultur für *Cutibacterium acnes* aufwies [212]. So ist es vorstellbar, dass *Cutibacterium acnes* über verschiedene Virulenzfaktoren eine akute subklinische Entzündung des Herzklappengewebes auslöst und sich zweizeitig als Biofilmbildner auf der Herzklappe ablagert. Nachfolgend führt eine chronische inflammatorische Reaktion zu strukturellen Veränderungen an der Herzklappe mit konsekutiver Ausprägung eines Klappenvitiums.

#### *Enterococcus faecalis*

Eine Infiltration mit *Enterococcus faecalis* konnte in 16 von 100 sVHD-Klappen sowie in 11 von 23 aIE-Klappen via TaqMan-PCR nachgewiesen werden.

Enterokokken zählen zu den Gram-positiven, Katalase-negativen, fakultativ anaeroben Bakterien und werden den Streptokokken der Lancefield Gruppe D zugeordnet [214].

*Enterococcus faecalis* ist Bestandteil der physiologischen Darm- und Mundflora und häufig assoziiert mit persistierenden periapicalen Zahnläsionen [215]. Die Literatur belegt nachhaltig, dass oralpathogene Bakterien der Mundflora eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von akut infektiösen Endokarditiden spielen [17, 52, 53]. Eine

periprozedurale Antibiotikaphylaxe dieser Bakterien wird in den aktuellen Leitlinien zum Management von Herzklappenerkrankungen u.a. bei Zahn- und Racheneingriffen empfohlen [10].

Kenntnisse über pathomechanistische Wirkung von *Enterococcus faecalis* auf das Herzklappengewebe sind nachhaltig untersucht worden [216, 217]. Über spezielle Oberflächenproteine wie „Enterococcal Surface Protein“ (Esp) und „Aggregation Substances“ (Agg) sowie über die Produktion von Cytolysin ist *Enterococcus faecalis* in der Lage sich an humanes Herzklappengewebe anzulagern, es zu besiedeln sowie direkt das Epithel zu schädigen [214, 218]. Diese Fähigkeit promotet *Enterococcus faecalis* in Europa zum vierthäufigsten und damit sehr gefürchteten Erreger einer akut infektiösen Endokarditis [219].

In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit konnte der Erreger in nahezu 50% der aIE- und 16% der sVHD-Klappen via TaqMan-PCR quantifiziert werden. Eine Korrelation zwischen molekularbiologisch detektierter DNA-Konzentration und mikrobiologischem Nachweis im Herzklappengewebe gibt es nicht. Der Range der Taq-PCR-positiven und gleichzeitig mikrobiologisch anzüchtbaren *Enterococcus faecalis* liegt zwischen  $10^2$  pg/ml und  $5 \times 10^5$  pg/ml. In diesem Bereich liegen jedoch auch die Taq-PCR-Konzentrationen in den nicht-endokarditischen Herzklappengeweben der sVHD-Kohorte. Auffällig ist jedoch, dass die mittlere Konzentration an DNA im Klappengewebe der aIE signifikant höher liegt als in der sVHD Kohorte.

Der mikrobiologische Nachweis von Erregern aus dem Herzklappengewebe lebt im Wesentlichen von der Möglichkeit den Erreger aus dem Synzytium zu isolieren, um ihn letztlich anzuzüchten. Im Gewebe der sVHD-Herzklappen ist ein höherer Grad an Kalk und Fibrose gegenüber der aIE-Pathologie nachweisbar. Neben seiner Fähigkeit zur direkten Herzklappenschädigung mithilfe des Virulenzfaktors Cytolysin [218] ist *Enterococcus faecalis* schon seit Jahren für seine Fähigkeit zur Kalzifizierung von humanem Gewebe bekannt [220]. Der Mechanismus zur gesteigerten Kalzifikationen wurde primär im Rahmen chronischer Infektionen des Urogenitaltrakts nachgewiesen [221]. Der kausale Nachweis einer *Enterococcus faecalis*-assoziierten Kalzifikation des Herzklappengewebes steht bis zum heutigen Tag noch aus. Betrachtet man die histopathologischen Befunde der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit, ist ein solcher Mechanismus der Kalzifikation von sVHD-Klappen durch *Enterococcus faecalis* durchaus denkbar.

Das Bakterium konnte intramural und tief eingebettet in den Kalzifikationen der sVDH-Klappen histopathologisch nachgewiesen werden. In einem Patienten mit sVHD ohne Anzeichen einer aktiven Entzündungsreaktion war es möglich den Keim aus seinem Herzklappengewebe zu isolieren und zusätzlich zum TaqMan-PCR-Nachweises mikrobiologisch anzuzüchten. Dies lässt eine bereits länger bestehende Persistenz des Erregers im Klappengewebe vermuten. Es ist hinreichend erforscht, dass *Enterococcus faecalis* als Biofilmbildner auch in der Lage ist Persister-Zell-Bildung zu generieren [216]. Diese Fähigkeit versetzt den Erreger in die Lage unter Stressbedingungen (z.B. Antibiose) und chronischen Umbauprozessen im Gewebe langfristig zu überleben, ohne antibiotikaresistent zu sein. Das erklärt, weshalb in den Patienten mit einer aIE und mikrobiologischem Nachweis durchschnittlich höhere DNA-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Hierbei handelt es sich definitionsgemäß um eine akute floride Infektion mit hoher Teilungsrate des *Enterococcus faecalis*.

Die Fähigkeit der Enterokokken Biofilme zu produzieren wird in der Literatur als fundamental für die Entwicklung einer akut infektiösen Endokarditis sowie auch persistierender endodontotischer und urogenitaler Infektionen beschrieben [147, 214]. Es ist durchaus vorstellbar, dass solche persistierende Infektionen, ausgelöst durch eine Biofilm-Bildung, wie im Rahmen persistierender periapicaler Zahninfektionen bereits nachgewiesen [215], auch in der Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen vorkommen können. Der letztendliche Beweis für diesen Zusammenhang steht jedoch noch aus.

So könnte auch *Enterococcus faecalis* auf einer bereits vorgeschädigten Herzklappe eine Biofilm-Bildung induzieren und über die Transformation zu bakteriellen Persister-Zellen im Herzklappengewebe persistieren. Die Literatur schlussfolgert, dass in der chemischen und immunologischen Mikro-Umgebung eines Biofilms über noch nicht genau bekannte Mechanismen eine Mineralisation und Kalzifikation des Biofilms induziert wird [222]. Geht man davon aus, dass sich *Enterococcus faecalis* als Biofilm am Herzklappengewebe anlagert, könnten die im Biofilm lebenden Persister-Zellen eine Antibiotikatherapie durchaus überstehen und auch nach konservativ behandelter, akut infektiöser Endokarditis im Herzklappengewebe trotz Verkalkung persistieren.

Diese Überlegung spielt, v.a. im Hinblick auf minimalinvasive Verfahren wie dem TAVI-Prozedere, eine klinisch herausragende Rolle. Persistieren Enterokokken als Persister-Zellen im strukturell veränderten Herzklappengewebe, könnten diese Bakterien im Rahmen einer kathetergestützten Herzklappenimplantation aus der Kalzifikation gelöst und letztlich freigesetzt werden [174].

Wenn man diesen Gedanken konsequent in den klinischen Alltag überträgt, dann profitieren Patienten mit geplanter TAVI-Implantation von einer prä- und ggf. perinterventionellen Antibiose insbesondere, wenn in der Krankengeschichte eine *Enterococcus faecalis*-Endokarditis vermutet oder nachgewiesen wurde.

#### *Enterococcus faecium*

Auch *Enterococcus faecium* konnte im Gewebe der sVHD-Patienten quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden, wobei insgesamt 3 von 100 Gewebeproben einen positiven molekulargenetischen Fingerabdruck zeigten. *Enterococcus faecium* stellt einen natürlichen Bestandteil der Darm- und Mundflora dar [223]. In den letzten Jahren zeigte sich der Erreger in der klinischen Praxis jedoch als ein immer häufiger vorkommender humanpathogener Erreger im Rahmen nosokomialer Infektionen [224]. Im Gegensatz zum vorhergenannten *Enterococcus faecalis* wird *Enterococcus faecium* in der Literatur nicht zu den Endokarditis-typischen Erregern gezählt [225], obwohl er, zwar seltener als *Enterococcus faecalis*, aber dennoch die Fähigkeit besitzt Virulenzfaktoren wie Cytolysin zu bilden [218]. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte sich der Erreger auch in der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit im Herzklappengewebe (3/100 sVHD; 5/23 aIE) deutlich seltener als andere Pathogene.

*Enterococcus faecium* unterscheidet sich von *faecalis* durch ein deutlich kleineres Genom, mit der geringeren Potenz Virulenzfaktoren zu kodieren [226]. Aus der Tatsache seiner niedrigen Virulenz sowie der verminderten Prävalenz des Erregers in der Pathogenese der aIE lässt sich ableiten, dass es sich primär um eine chronisch rezidivierende subklinische Infektion mit einer Besiedlung einer bereits vorgeschädigten Herzklappe handelt.

Diese Vorschädigung könnte durch höher virulente Bakterien bedingt sein. In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich eine Ko-Infiltration mit *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus pyogenes* in 2 von 3 Gewebeproben. Aber auch die Vorschädigung des Herzklappengewebes, unabhängig von einer bakteriellen Infektion, beispielsweise durch mechanisch degenerative Veränderungen, kann der Nährboden für eine zweizeitige Infektion des Herzklappengewebes mit *Enterococcus faecium* sein. Es ist vorstellbar, dass der Erreger im Rahmen von Mund- und Darmschleimhautverletzungen oder Zahneingriffen rezidivierend Bakteriämien verursacht [217] und somit rezidivierende, subklinische Entzündungsreaktionen an der Herzklappe auslöst, die letztlich ursächlich für eine strukturelle Veränderung des Klappengewebes sein können. Hinsichtlich der Tatsache seines relativ seltenen Auftretens im Herzklappengewebe und seiner niedrigen

Virulenz erscheint eine großzügige Antibiotikatherapie bei alleinigem molekulargenetischem Erregernachweis nicht indiziert.

Bei vergleichbaren DNA-Konzentrationen, wie in Herzklappen von Patienten mit einer akut infektiösen Endokarditis sowie direktem mikrobiologischen Kulturnachweis von *Enterococcus faecium* im chronisch strukturell verändertem Herzklappengewebe, sollte das Bakterium jedoch periprozedural antibiotisch abgedeckt werden, um das Risiko einer möglichen akuten Infektion des Herzklappengewebes zu verringern.

### *Staphylococcus aureus*

Epidemiologische Untersuchungen und Review-Arbeiten belegen eindrucksvoll den Stellenwert einer *Staphylococcus aureus*-Bakteriämie als kausales Agens für eine Endokarditis weltweit [219, 227, 228]. Sowohl in Europa als auch in Asien, Afrika und auf dem amerikanischen Kontinent zählt die *Staphylococcus aureus*-Endokarditis zu den herausforderndsten Entitäten im Hinblick auf die Therapie [219]. Die Leitlinienrelevanten Publikationen präferieren therapeutisch ein chirurgisch-interventionelles Vorgehen, wenn in der Blutkultur eine *Staphylococcus aureus*-Bakteriämie und echokardiografisch endokarditische Vegetationen nachgewiesen werden können [229, 230]. Demzufolge kommt der Diagnostik des Erregers in der Blutkultur ein besonders hoher Stellenwert zu [231].

*Staphylococcus aureus* ist einer der häufigsten Auslöser endovaskulärer Infektionen und häufig mit einem aggressiven und komplikationsreichen Verlauf assoziiert [232]. Der Erreger verfügt über zahlreiche genetisch determinierte Virulenzfaktoren, die es ihm ermöglichen sich an humanes Gewebe anzulagern und über Toxine direkt zu schädigen [233, 234]. Die Adhäsion von *Staphylococcus aureus* an das Gewebe wird über Oberflächenproteine wie Fibronectin-bindendes Protein (FrBPA), Fibrinogen-bindendes Protein (Efb) oder dem sogenannten Clumping-Faktor (ClfA) vermittelt [234]. Über eine zweite Gruppe von Virulenzfaktoren, bestehend aus Enzymen und nicht enzymatischen Toxinen wie Hämolsine oder Leukozidine (LukD, PVL) ist *Staphylococcus aureus* in der Lage Zellwände des Zielgewebes zu perforieren und somit die Zellen direkt zu schädigen [234]. Klinisch imponieren diese hochgradig pathogenen Eigenschaften in einer fulminanten, zeitlich akuten Destruktion des Herzklappengewebes mit einem primär hochgradigen Klappenitium [235]. Die Mortalität einer nativen *Staphylococcus aureus*-Endokarditis liegt innerhalb eines Jahres bei bis zu 45% [236] und bei Prothesenendokarditiden sogar bei über 48 % [237, 238]. Unbestritten ist dieser Keim eine wirkliche Herausforderung im Rahmen der Antibiotikatherapie und des

chirurgischen Vorgehens, da die Gewebedestruktion sich oftmals nicht auf die Herzklappe allein beschränkt [239, 240]. Auch die Freisetzung von Toxinen wie das Alpha-Toxin oder/und Leukozidin AB fördert den fulminanten Krankheitsverlauf durch eine gezielte Manipulation des Immunsystems [145].

All diese Erkenntnisse und die stetig wachsenden Veröffentlichungen führen dennoch seit Jahrzehnten nicht zu einer verminderten Prävalenz der *Staphylococcus aureus* assoziierten Endokarditis [78, 227, 240].

Untersuchungen von Oberbach et al. (2017) legen nahe, dass mikrobiologische Blutkulturbefunde auch für *Staphylococcus aureus* nicht hinreichend valide die tatsächliche Klappeninfektionsrate widerspiegelt [44]. Das Ziel der vorliegenden Studie war u.a. durch eine TaqMan-PCR-Analyse die Konzentration einer *Staphylococcus aureus* Infektion in Herzklappengewebe von aIE-Patienten in Korrelation mit positiven Klappenkulturen abzubilden. Es zeigte sich, dass aIE-Patienten mit einem positiven mikrobiologischen Kulturbefund in der Herzklappe signifikant höhere Taq-PCR basierende DNA-Konzentrationen aufwiesen. Die hohe Teilungsrate von *Staphylococcus aureus* in einer akuten Entzündungsreaktion ist in der Literatur gut belegt [241] und lässt für die eigenen Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass in einer aIE mit einer sehr hohen Erregerlast im Klappengewebe zu rechnen ist.

Die eigenen Befunde legen jedoch, in Zusammenschau mit den Erkenntnissen aus der Literatur, nahe, dass *Staphylococcus aureus* auch eine wesentliche Rolle in der Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen spielen kann. So konnte der Erreger in 15 von 100 untersuchten sVHD-Klappen molekularbiologisch via TaqMan-PCR nachgewiesen werden. Die sVHD-Klappen zeigten eine Verteilung der nachgewiesenen DNA-Konzentration von  $10^1$  bis  $3 \times 10^5$  pg/ml, wobei die *Staphylococcus aureus*-positiven aIE-Klappen ohne mikrobiologischen Nachweis die gleiche Verteilungsbreite zeigten. Genau diese aIE-Klappen ohne mikrobiologischen *Staphylococcus aureus*-Nachweis zeigten eine Ko-Infektion mit anderen bakteriellen Erregern, sodass davon auszugehen ist, dass die ursächliche akute Klappenschädigung nicht auf *Staphylococcus aureus*, sondern auf den/die koinfiltrierten Erreger zurückzuführen ist.

Es ist bekannt, dass nicht alle *Staphylococcus aureus*-Stämme dieselben Virulenzfaktoren besitzen und das Gewebe somit nicht gleichermaßen schädigen können [233, 242]. Die spezifische TaqMan-PCR-Primer-Paar/Sonde ist nicht in der Lage *Staphylococcus aureus*-Stämme differenziert abzubilden. Der Grad der Virulenz, bspw. die Expression

von Endo- und Exotoxinen, wird jedoch auf Stammebene determiniert und nicht durch Speziesebene repräsentiert [243, 244]. Somit bleibt es zu vermuten, dass sowohl in der aIE-Kohorte als auch in der sVHD-Kohorte mit molekularbiologisch positivem Nachweis einer *Staphylococcus aureus*-Infektion bzw. -Infiltration, von unterschiedlich virulenten Stämmen auszugehen ist, die schlussfolgernd einen differenzierten klinischen Verlauf initiieren.

*Staphylococcus aureus* ist, vergleichbar der pathogenen Entität des *Enterococcus faecalis*, in der Lage einen Biofilm als Protektion zu synthetisieren und Persister-Zellen als Überlebensstrategie zu generieren [245, 246]. Es ist also vorstellbar, dass auch *Staphylococcus aureus* sich auf bereits vorgeschädigten Herzklappen ablagert, Biofilme bildet und über unterschiedliche Mechanismen eine Fibrosierung/Verkalkung des Gewebes induziert und damit die Entwicklung einer sVHD triggert. In Abgrenzung zu anderen Herzklappen-relevanten Bakterien scheint jedoch der *Staphylococcus aureus* seine virulente Potenz in Form einer sehr hohen Bakterienlast, mit einer Vielzahl an Virulenzfaktoren, auszuüben und somit primär für akute, fulminante Erkrankungen der Herzklappe verantwortlich zu sein.

#### *Clostridium difficile*

Ein letzter zu betrachtender Erreger des amplifizierten Erregerspektrums ist das *Clostridium difficile*. Der Erreger wurde in 1 von 100 sVHD- Klappen via PCR nachgewiesen.

Wie alle bereits zuvor genannten Erreger wurde auch *Clostridium difficile* histopathologisch intramural im Herzklappengewebe nachgewiesen und lässt eine Rolle in der Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen vermuten.

*Clostridium difficile* ist in geringem Maße natürlicher Bestandteil der physiologischen Darmflora und als opportunistischer, obligat anaerober Erreger gilt er als der wichtigste Auslöser nosokomialer Durchfallerkrankungen [247, 248]. Für Infektionen am Herzklappengewebe tritt *Clostridium difficile* eher seltener in Erscheinung, obwohl bekannt ist, dass opportunistische Anaerobier dennoch schwerwiegende akute Endokarditiden auslösen können [249].

*Clostridium difficile* ist über zahlreiche Pathogenitätsfaktoren in der Lage humanes Gewebe zu schädigen, wobei die beiden Virulenzfaktoren Toxin A (TcdA) und Toxin B (TcdB) die wohl bedeutendste Rolle spielen [248]. Die beiden Toxine lösen über die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen und der Infiltration von neutrophilen Granulozyten eine Entzündung und direkte Schädigung des infizierten

Gewebes aus [250]. Außerdem ist der Erreger fähig Sporen zu bilden, Biofilme zu formieren und dadurch chronisch rezidivierende Infektionen auszulösen [148].

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse der Literatur und der eigenen Untersuchungsergebnisse ist es denkbar, dass *Clostridium difficile*-Erreger das Gewebe der Herzklappen direkt oder indirekt schädigen. Der direkte Mechanismus ist auf die Wirkung der beiden Toxine zurückzuführen. Beide Toxine (A und B) werden in den Zellen internalisiert und lösen letztlich eine Apoptose mit begleitender endothelialer Dysfunktion aus [251]. Zusätzlich führen diese Pathomechanismen zu sekundären Umbauprozessen des Klappengewebes, die wiederum die Funktion der Herzklappe wesentlich beeinflussen. Der Grad der Klappenzerstörung und einer möglichen Immunantwort bestimmt offensichtlich das Ausmaß der Klappendestruktion.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die beschriebenen 6 Bakterienspezies zwar unterschiedliche Virulenzfaktoren und Pathogenitätsmechanismen ausprägen, jedoch letztlich das Herzklappengewebe direkt und/oder indirekt schädigen können. Der Konsens vieler Veröffentlichungen zeigt, dass oftmals die Entstehung struktureller Herzklappenerkrankungen ein Abbild aktiver Prozesse, ausgelöst durch eine chronische Inflammation des Gewebes und nicht wie früher angenommen ein passiver Prozess der Degeneration ist [1, 15, 23]. Der kausale Mechanismus der Kalzifikation und Stenosierung der Herzklappen nach bakterieller Infektion ist aktuell Gegenstand wissenschaftlicher Forschung [17, 51]. Interstitielle Zellen im Herzklappengewebe können sich, getriggert durch proinflammatorische Zytokine, zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren und, bei einer gleichzeitig bestehenden Störung des Calciumstoffwechsels, eine Mineralisation des Gewebes auslösen [2, 25] Ob die bakteriellen Erreger die Kalzifikation und Stenosierung der Herzklappen direkt auslösen oder ob sie lediglich indirekt eine Rolle in der Induktion einer chronischen Entzündungsreaktion spielen, gilt es noch zu klären.

### ***Konsequenz der eigenen wissenschaftlichen Ergebnisse***

In Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit konnten in 72% der untersuchten sVHD-Klappen bakterielle Erreger molekularbiologisch via TaqMan-PCR-Analyse im Herzklappengewebe nachgewiesen werden. In seltenen Fällen gelang zudem eine direkte mikrobiologische Anzucht der Bakterien aus chronisch strukturell veränderten Herzklappen.

Bisher interpretierte man den mikrobiologischen und molekularbiologischen Nachweis von Bakterien in Herzklappen von sVHD-Patienten primär als Kontamination bzw. erkannte darin keine Konsequenz für klinische Handlungspfade.

Aktuelle Ergebnisse unterstützen jedoch die Hypothese einer infektiösen Pathogenese hin zur chronisch strukturellen Herzklappenerkrankung. Besonders durch neue Interventionen wie TAVI oder die offen chirurgische Implantation von selbstexpandierenden Herzklappen (Intuity Elite Klappe) gewinnt die Erkenntnis einer infektiösen Pathogenese chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen einen neuen klinischen Stellenwert. Dieser reicht von der kulturunabhängigen Diagnostik bis hin zur prä- und postoperativen Antibiotikatherapie zur spezifischen Eradikation der ursächlichen Bakterien.

Vor allem jene Patienten mit einer Prädisposition zu chronisch rezidivierenden Bakteriämien, bzw. Patienten mit einer akut infektiösen Endokarditis in der Krankenvorgeschichte, könnten von periprozeduralen Antibiotikatherapien profitieren, um eine postinterventionelle Prothesenendokarditis zu verhindern.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass sowohl mikrobiologische als auch molekularbiologische Diagnostik im klinischen Alltag notwendig sind, um das Spektrum der Bakterien in einer verkalkten Herzklappe zu erfassen. Die Metagenomanalyse ist hierfür eine sensitive und hochspezifische Methode, um Erkenntnisse über eine polymikrobielle Pathophysiologie der sVHD zu beurteilen. Darüber hinaus belegen die eigenen Ergebnisse, dass ein bisher kaum berücksichtigter Anteil von sVHD durch chronische Entzündungen repräsentiert oder durch sekundäre Bakterieninfiltration getriggert wird. Es ist zwingend notwendig histopathologische und molekularbiologische Analysen von reseziertem Klappengewebe als Standardmethode zur Diagnostik von Herzklappenerkrankungen einzubeziehen.

## 7. Zusammenfassung

Die kalzifizierende Aortenklappenstenose stellt in den westlichen Industrienationen die häufigste Herzklappenerkrankung überhaupt und hinter arteriellem Hypertonus und der koronaren Herzerkrankung die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung dar. Durch den demographischen Wandel, mit einer immer älter werdenden Bevölkerung, konnte in den letzten Jahren eine deutlich steigende Inzidenz der Erkrankung beobachtet werden.

Die bis heute noch nicht vollständig verstandene Pathogenese der strukturellen Herzklappenerkrankung (sVHD) reicht von rheumatisch bedingten Veränderungen bis hin zu chronisch degenerativen Umbauprozessen in Form einer aktiven Inflammation des Klappengewebes. Aktuelle wissenschaftliche Arbeiten weisen darauf hin, dass dieser Prozess der aktiven Inflammation u.a. über eine bakterielle, subklinische Infektion des Klappengewebes getriggert werden kann.

Obwohl bereits Ende der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts Bakterien in chronisch strukturell veränderten Herzklappen nachgewiesen wurden, interpretierte man diesen Nachweis als Kontamination des Herzklappengewebes bzw. sah in dieser Erkenntnis keine klinische Konsequenz, da durch operative Entfernung der Klappe das infiltrierte Gewebe vollständig entfernt wurde. In der klinischen Therapielandschaft haben wir in der modernen Medizin Möglichkeiten, strukturell erkrankte Herzklappen durch Implantation von neuen biologischen Herzklappen mit minimalinvasiver Technik zu ersetzen. Bei diesen Verfahren wird die stark verkalkte Klappe in situ belassen. Dies bringt das Risiko einer Freisetzung infiltrierter Bakterien aus dem Klappengewebe mit sich, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit der gefürchteten Prothesenendokarditis deutlich erhöht wird.

Moderne molekulargenetische Methoden ermöglichen den Nachweis des gesamten mikrobiellen Spektrums im Herzklappengewebe, unabhängig von der mikrobiologischen Kultivierung. Insbesondere die Metagenomanalyse ist eine empfindliche und hochspezifische Analysemethode, die einen tieferen Einblick in die Pathogenität der Krankheiten ermöglicht.

Im Rahmen der vorliegenden, multizentrischen, prospektiven Kohortenstudie, wurden im Zeitraum von März 2016 bis Juni 2017 Patienten mit chronisch struktureller Herzklappenerkrankung sowie akut infektiöser Endokarditis mit Indikation zum operativen Klappenersatz rekrutiert. Aus dieser Kohorte wurden 100 sVHD-Patienten und 23 aIE-Patienten randomisiert. Die explantierten Herzklappen wurden mithilfe

spezieller histopathologischer sowie mikrobiologischer Methoden analysiert. Im Vordergrund stand darüber hinaus die molekulargenetische Untersuchung des Herzklappengewebes auf eine mögliche bakterielle Infiltration/Infektion. Die verwendete TaqMan-PCR stellt eine hochspezifische und quantitative Analysemethode für den Nachweis zahlreicher bakterieller Erreger dar. Um die DNA von Bakterienspezies hochspezifisch und sensitiv abbilden zu können, wurden für 8 ausgewählte Bakterien jeweils ein spezifisches Primer-Paar und eine spezifische TaqMan-Sonde etabliert. Diese 8 Taq-PCR-Analysen wurden als Screening für alle sVHD-Patienten angewandt. In 72% der nicht infektiösen, chronisch strukturell veränderten Herzklappengewebeproben konnte ein positiver Nachweis für bakterielle DNA erbracht werden. Die 6 genannten Keime sind: *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Enterococcus faecalis* & *faecium*, *Streptococcus pyogenes* und *Clostridium difficile*.

Über die spezielle Aufbereitung des Herzklappengewebes, mit anschließender Vorbehandlung im Ultraschallbad, gelang in der eigenen Kohorte bei insgesamt 5 sVHD-Patienten, neben dem molekulargenetischen DNA-Nachweis, zusätzlich der direkte mikrobiologische Kulturnachweis von *Staphylococcus warneri*, *saccharolyticus* sowie *haemolyticus*, *Enterococcus faecalis* und *Clostridium difficile*.

In den letzten zehn Jahren hat sich der Einsatz von kathetergestützten Implantations-Verfahren (TAVI) zur Behandlung von sVHD herauskristallisiert und rasant ausgeweitet. In Anbetracht der minimalinvasiven Natur des Verfahrens erhoffte man sich eine niedrigere Rate der frühen Prothesenklappenendokarditis. Im Gegensatz dazu zeigten sich jedoch ähnlich hohe bzw. in einigen Arbeiten sogar höhere postinterventionelle Endokarditisraten im Vergleich zum konventionell chirurgischen Klappenersatz. Die eigenen Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine primär bakterielle Infiltration in verkalkten Klappenstrukturen der Nährboden für eine TAVI-implantierte postinterventionelle Prothesenendokarditis sein kann.

Beim konventionell chirurgischen Klappenersatz wird die Quelle einer möglichen Infektion durch die Entfernung von beeinträchtigtem Klappengewebe vor der Implantation der Prothese weitgehend eliminiert. Aber auch hier führen neuere Entwicklungen zur offen chirurgischen Implantation von selbstexpandierenden Klappenprothesen (Intuity Elite Klappe), die im Bereich des Klappenannulus die Verkalkung als Widerlager zur Klappenbefestigung nutzen. Eine vollständige Entfernung des Kalkrings ist hierbei nicht vorgesehen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass sowohl mikrobiologische als auch molekularbiologische Diagnostik im klinischen Alltag notwendig sind, um das Spektrum der Bakterien in einer verkalkten Herzklappe zu erfassen. Die Metagenomanalyse ist hierfür eine sensitive und hochspezifische Methode, um Erkenntnisse über eine polymikrobielle Pathophysiologie der sVHD zu beurteilen. Darüber hinaus belegen die eigenen Ergebnisse, dass ein bisher kaum berücksichtigter Anteil von sVHD durch chronische Entzündungen repräsentiert oder durch sekundäre Bakterieninfiltration getriggert wird. Es ist zwingend notwendig histopathologische und molekularbiologische Analysen von reseziertem Klappengewebe als Standardmethode zur Diagnostik von Herzklappenerkrankungen einzubeziehen.

## 8 Anhang

### 8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Graduierung der Aortenklappenstenose nach aktuellen amerikanischen Leitlinien nach Nishimura et al. [91].....	14
Tabelle 2: Auflistung der in der Immunhistochemie verwendeten Farbstoffe, Antikörper und Lösungsmittel .....	20
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primer zum molekularbiologischen Erregernachweis aus dem Herzklappengewebe sowie notwendige DNA-Isolations-Kits. ....	21
Tabelle 4: Weiterführung der Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primer sowie der DNA-Isolations-Kits.....	22
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kulturmedien .....	22
Tabelle 6: Weiterführung der Tabelle 4; Auflistung der verwendeten Kulturmedien ...	23
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Geräte und Software .....	23
Tabelle 8: Darstellung der modifizierten Duke-Kriterien nach Li [114].....	27
Tabelle 9: Definition der Risikogruppen des EuroSCORE I nach [119] .....	33
Tabelle 10: Definition der Risikogruppen nach EuroSCORE II nach [120].....	33
Tabelle 11: Definition der Risikogruppen nach STS-Score nach [121].....	34
Tabelle 12: Phänotypisierung der Kohorten mit chronischer bzw. akuter Herzklappenerkrankung: der Vergleich erfolgte über die Berechnung des Student`s t-Test für metrische Variablen sowie über Fisher`s exaktem Test für ordinale Variablen. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wird als statistisch signifikant angesehen.....	42

### 8.2 Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1</u> : Präoperativer, echokardiographische und intraoperativ makroskopische Darstellung einer schweren Aortenklappenstenose; Befund aus der Herzchirurgischen Poliklinik Großhadern .....	2
<u>Abbildung 2</u> : A: Schwer verkalkte Aortenklappenprothese; B: Explantierte, native Aortenklappe mit großen Kalkplaques; Befund aus der Herzchirurgischen Poliklinik Großhadern .....	4
<u>Abbildung 3</u> : Elektronen-mikroskopische Abbildung (SEM) einer, mit bakteriellen Kokken besiedelten, nativen Aortenklappe. Teilweise zerstörte Kokken (B), völlig intakte Kokken (C) Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Oberbach Andreas .....	6

<u>Abbildung 4</u> : FIB-SEM basierte, ultrastrukturelle Darstellung von bakteriell infiltriertem Herzklappengewebe; Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Oberbach Andreas.....	6
<u>Abbildung 5</u> : Echokardiographische Darstellung einer hochgradigen Aortenklappenstenose mit einem maximalen Druckgradienten von $\Delta P \geq 40\text{mmHg}$ ; Befund aus der Herzchirurgischen Poliklinik Großhadern.....	12
<u>Abbildung 6</u> : Dreidimensionale, echokardiographische Rekonstruktion einer massiv verkalkten, stenosierten Aortenklappe; Befund aus der Herzchirurgischen Poliklinik Großhadern .....	13
<u>Abbildung 7</u> : Fluss-Diagramm der Patienten-Rekrutierung und Materialgewinnung .....	25
<u>Abbildung 8</u> : Darstellung einer Herz-Lungen-Maschine, als Methode der Wahl zur extrakorporalen Zirkulation im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe; Das Foto wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Andreas Oberbach.....	28
<u>Abbildung 9</u> : Prozess der hochspezifischen, quantitativen TaqMan-PCR. Erstellt in Anlehnung an eine Grafik von Wang et al.[125].....	40
<u>Abbildung 10</u> : Prozentualer Anteil der Patienten mit internistischen Komorbiditäten....	44
<u>Abbildung 11</u> : Präoperativ gemessene laborchemische Entzündungsparameter (CRP, Leukozyten, IL-6) der sVHD und aIE Kohorte.....	46
<u>Abbildung 12</u> : 1+: 2 Befunde von mittel sowie hochgradiger Aortenklappenstenose; 3: Messung der Vmax über dem linksventrikulären Ausflusstrakts für die Berechnung der KÖF; 4: Befundbogen der LMU; 5 3D- Rekonstruktion einer hochgradigen Aortenklappenstenose.....	48
<u>Abbildung 13</u> : Linksventrikuläre Ejektionsfraktion und Klassifikation der erkrankten Klappen.....	48
<u>Abbildung 14</u> : Individuelles operatives Mortalitätsrisiko der 2 Kohorten (sVHD, aIE) berechnet mit den online-verfügbaren Scores: EURO I, EURO II, STS-Score; .....	49
<u>Abbildung 15</u> : Vergleich der intraoperativen Verlaufsdaten der 2 Kohorten (1 sVHD, 2 aIE.....	50
<u>Abbildung 16</u> : Intraoperative, makroskopische Beurteilung der erkrankten und gesunden Herzklappen; Befund aus der Herzchirurgischen Poliklinik Großhadern .....	51
<u>Abbildung 17</u> : Histopathologische Untersuchung der Kultur-positiven sVHD – Klappengewebe.....	54
<u>Abbildung 18</u> : Färbung und histopathologische Untersuchung des Klappengewebes. A: Deutliche Fibrosierung und Verkalkung B: Neben der Fibrosierung ist auch ein deutliches Entzündungszellinfiltrat erkennbar. C: Gesundes Klappengewebe weist keine Fibrose und nur lockere Kollagenfaserbündel auf.....	55
<u>Abbildung 19</u> : Immunhistochemische Färbung des explantierten Klappengewebes A: Nachweis von Staph. aureus über die immunhistochemische Antikörper-Färbung im	

chronisch strukturell verändertem Klappengewebe. Akut infektiöse Endokarditis (B): Ko-Lokalisation von Staph. aureus mit Makrophagen .....	56
<u>Abbildung 20</u> : Immunhistochemische Darstellung der 6 bakteriellen Erreger im kalzifizierten Klappengewebe.....	57
<u>Abbildung 21</u> : Darstellung der sVHD- und aIE Patienten mit positivem TaqMan-PCR-Nachweis.....	58
<u>Abbildung 22</u> : Konzentrationsanalyse bakterieller DNA über die quantitative TaqMan-PCR in 100 sVHD und 23 aIE Klappen. Für 6 der 8 gemessenen Keime, konnte bakterielle DNA im Gewebe chronisch struktureller Herzklappenerkrankungen nachgewiesen werden.....	60
<u>Abbildung 23</u> : Entzündungsparameter im postoperativen Verlauf.....	61
<u>Abbildung 24</u> : Prozentuale Verteilung der postoperativen Komplikationen der Patienten mit sVHD, sVHD-Subgruppen Kultur+ und PCR+ verglichen mit den Patienten mit akut infektiöser Endokarditis. Darstellung der berechneten p-Werte.....	62
<u>Abbildung 25</u> : 30-Tage Überlebensrate.....	64

### 8.3 Veröffentlichungen

In folgenden Originalartikeln wurden bereits Teile dieser Dissertation publiziert:

Oberbach, A., et al., *Bacterial infiltration in structural heart valve disease*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2019.

Oberbach, A., et al., *Quantification of Multiple Bacteria in Calcified Structural Valvular Heart Disease*. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2019.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Lindman, B.R., et al., *Calcific aortic stenosis*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16006.
2. Venardos, N., et al., *Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation*. J Surg Res, 2014. **190**(1): p. 1-8.
3. Izumi, C., *Asymptomatic severe aortic stenosis: challenges in diagnosis and management*. Heart, 2016. **102**(15): p. 1168-76.
4. Rezzoug, N., et al., *The clinical impact of valvular heart disease in a population-based cohort of subjects aged 80 and older*. BMC Cardiovasc Disord, 2016. **16**: p. 7.
5. Bosse, Y., P. Mathieu, and P. Pibarot, *Genomics: the next step to elucidate the etiology of calcific aortic valve stenosis*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(14): p. 1327-36.
6. Coffey, S., B. Cox, and M.J. Williams, *The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(25 Pt A): p. 2852-61.
7. Vahanian, A., et al., *[Guidelines on the management of valvular heart disease]*. Rev Esp Cardiol, 2007. **60**(6): p. 1e-50e.
8. Liu, X. and Z. Xu, *Osteogenesis in calcified aortic valve disease: From histopathological observation towards molecular understanding*. Prog Biophys Mol Biol, 2016. **122**(2): p. 156-161.
9. Natarajan, D. and B. Prendergast, *Aortic stenosis - pathogenesis, prediction of progression, and percutaneous intervention*. J R Coll Physicians Edinb, 2017. **47**(2): p. 172-175.
10. Baumgartner, H., et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*. Eur Heart J, 2017. **38**(36): p. 2739-2791.
11. Derbali, H., et al., *Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2*. Am J Pathol, 2010. **176**(6): p. 2638-45.
12. Mohler, E.R., 3rd, et al., *Bone formation and inflammation in cardiac valves*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1522-8.
13. Rashedi, N. and C.M. Otto, *Aortic Stenosis: Changing Disease Concepts*. J Cardiovasc Ultrasound, 2015. **23**(2): p. 59-69.
14. Thaden, J.J., V.T. Nkomo, and M. Enriquez-Sarano, *The global burden of aortic stenosis*. Prog Cardiovasc Dis, 2014. **56**(6): p. 565-71.
15. Small, A., et al., *Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(4): p. 623-632.
16. Fazio, G., et al., *Atherosclerosis, inflammation and Chlamydia pneumoniae*. World J Cardiol, 2009. **1**(1): p. 31-40.
17. Oliveira, F.A., et al., *Molecular Analysis of Oral Bacteria in Heart Valve of Patients With Cardiovascular Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction*. Medicine (Baltimore), 2015. **94**(47): p. e2067.
18. van Kesteren, F., et al., *Autopsy after transcatheter aortic valve implantation*. Virchows Arch, 2017. **470**(3): p. 331-339.
19. Chourdakis, E., et al., *Endocarditis after transcatheter aortic valve implantation: a current assessment*. J Geriatr Cardiol, 2018. **15**(1): p. 61-65.
20. Andell, P., et al., *Epidemiology of valvular heart disease in a Swedish nationwide hospital-based register study*. Heart, 2017. **103**(21): p. 1696-1703.
21. Ramos, J., et al., *Large-scale assessment of aortic stenosis: facing the next cardiac epidemic?* Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2017.
22. Wald, D.S., et al., *Watchful Waiting in Aortic Stenosis: The Problem of Acute Decompensation*. Am J Med, 2017.
23. Sathyamurthy, I., et al., *Risk factor profile of calcific aortic stenosis*. Indian Heart J, 2016. **68**(6): p. 828-831.
24. Lim, J., et al., *Inflammation Drives Retraction, Stiffening, and Nodule Formation via Cytoskeletal Machinery in a Three-Dimensional Culture Model of Aortic Stenosis*. Am J Pathol, 2016. **186**(9): p. 2378-89.

25. Galeone, A., et al., *Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand*. Int J Cardiol, 2013. **169**(4): p. 296-304.
26. Helske, S., et al., *Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(9): p. 1859-66.
27. Lindroos, M., et al., *Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample*. J Am Coll Cardiol, 1993. **21**(5): p. 1220-5.
28. Back, M. and S.C. Larsson, *Bioactive lipids in aortic valve stenosis-a possible link to atherosclerosis?* Cardiovasc Res, 2017. **113**(11): p. 1276-1278.
29. Cote, N., et al., *Oxidized low-density lipoprotein, angiotensin II and increased waist circumference are associated with valve inflammation in prehypertensive patients with aortic stenosis*. Int J Cardiol, 2010. **145**(3): p. 444-9.
30. Yan, A.T., et al., *Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study*. J Am Coll Cardiol, 2017. **69**(12): p. 1523-1532.
31. Mohty, D., et al., *Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(1): p. 187-93.
32. Ten Kate, G.R., et al., *Increased Aortic Valve Calcification in Familial Hypercholesterolemia: Prevalence, Extent, and Associated Risk Factors*. J Am Coll Cardiol, 2015. **66**(24): p. 2687-2695.
33. Rossebo, A.B., et al., *Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1343-56.
34. Akat, K., et al., *Calcium metabolism in adults with severe aortic valve stenosis and preserved renal function*. Am J Cardiol, 2010. **105**(6): p. 862-4.
35. Masjedi, S., et al., *Comparison of calcification potential of valvular interstitial cells isolated from individual aortic valve cusps*. Cardiovasc Pathol, 2016. **25**(3): p. 185-94.
36. Mahmut, A., et al., *Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(5): p. 460-9.
37. Bayram, A., et al., *Demonstration of Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in atherosclerotic coronary arteries, nonrheumatic calcific aortic and rheumatic stenotic mitral valves by polymerase chain reaction*. Anadolu Kardiyol Derg, 2011. **11**(3): p. 237-43.
38. Nakano, K., et al., *Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(1): p. 64-8.
39. Kolltveit, K.M., et al., *Multiple Bacteria in Calcific Aortic Valve Stenosis*. Microbial Ecology in Health and Disease, 2002. **14**(2): p. 110-117.
40. Campbell, W.N., W. Tsai, and L.A. Mispireta, *Evaluation of the practice of routine culturing of native valves during valve replacement surgery*. Ann Thorac Surg, 2000. **69**(2): p. 548-50.
41. Chuard, C., C.M. Antley, and L.B. Reller, *Clinical utility of cardiac valve Gram stain and culture in patients undergoing native valve replacement*. Arch Pathol Lab Med, 1998. **122**(5): p. 412-5.
42. Giladi, M., et al., *Microbiological cultures of heart valves and valve tags are not valuable for patients without infective endocarditis who are undergoing valve replacement*. Clin Infect Dis, 1997. **24**(5): p. 884-8.
43. Juvonen, J., et al., *Detection of Chlamydia pneumoniae in human nonrheumatic stenotic aortic valves*. J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(5): p. 1054-9.
44. Oberbach, A., et al., *New insights into valve-related intramural and intracellular bacterial diversity in infective endocarditis*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0175569.
45. Zamorano, J., et al., *Prevalence of Chlamydia pneumoniae in the atherosclerotic plaque of patients with unstable angina and its relation with serology*. Int J Cardiol, 2003. **89**(2-3): p. 273-9.
46. Kim, D.K., et al., *Chlamydia pneumoniae accompanied by inflammation is associated with the progression of atherosclerosis in CAPD patients: a prospective study for 3 years*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(3): p. 1011-8.

47. Zairis, M.N., et al., *Serologic markers of persistent Chlamydia pneumoniae infection and long-term prognosis after successful coronary stenting*. Am Heart J, 2003. **146**(6): p. 1082-9.
48. Juvonen, J., et al., *Can degenerative aortic valve stenosis be related to persistent Chlamydia pneumoniae infection?* Ann Intern Med, 1998. **128**(9): p. 741-4.
49. Edvinsson, M., et al., *Presence of Chlamydomphila pneumoniae DNA but not mRNA in stenotic aortic heart valves*. Int J Cardiol, 2010. **143**(1): p. 57-62.
50. Klochkov, V.A., et al., *[Effect of therapy with antibiotics on lipid metabolism and antioxidant reserve of patients with ischemic heart disease during Chlamydia pneumoniae infection]*. Kardiologiia, 2005. **45**(12): p. 58-61.
51. Kaden, J.J., et al., *[Chlamydia pneumoniae--a new risk factor for calcific aortic stenosis?]*. Med Klin (Munich), 2005. **100**(6): p. 334-9.
52. Nakano, K., et al., *Detection of cariogenic Streptococcus mutans in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(9): p. 3313-7.
53. Carinci, F., et al., *Focus on periodontal disease and development of endocarditis*. J Biol Regul Homeost Agents, 2018. **32**(2 Suppl. 1): p. 143-147.
54. Zebrack, J.S. and J.L. Anderson, *The role of infection in the pathogenesis of cardiovascular disease*. Prog Cardiovasc Nurs, 2003. **18**(1): p. 42-9.
55. Cohen, D.J., et al., *Role of oral bacterial flora in calcific aortic stenosis: an animal model*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(2): p. 537-43.
56. Baris, O., T. Demir, and M. Gulluce, *Investigation of In vitro Mineral forming bacterial isolates from supragingival calculus*. Niger J Clin Pract, 2017. **20**(12): p. 1571-1575.
57. Moorer, W.R., J.M. Ten Cate, and J.F. Buijs, *Calcification of a cariogenic Streptococcus and of Corynebacterium (Bacterionema) matruchotii*. J Dent Res, 1993. **72**(6): p. 1021-6.
58. Zbinden, A., et al., *Streptococcus tigurinus, a novel member of the Streptococcus mitis group, causes invasive infections*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(9): p. 2969-73.
59. El Kebir, D., et al., *Mild acidosis delays neutrophil apoptosis via multiple signaling pathways and acts in concert with inflammatory mediators*. J Leukoc Biol, 2017. **102**(6): p. 1389-1400.
60. Zhang, J., et al., *Local inflammation induces complement crosstalk which amplifies the antimicrobial response*. PLoS Pathog, 2009. **5**(1): p. e1000282.
61. Fisher, R.A., B. Gollan, and S. Helaine, *Persistent bacterial infections and persister cells*. Nat Rev Microbiol, 2017. **15**(8): p. 453-464.
62. Helaine, S., et al., *Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters*. Science, 2014. **343**(6167): p. 204-8.
63. Germain, E., et al., *Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA*. Mol Cell, 2013. **52**(2): p. 248-54.
64. Mechler, L. and R. Bertram, *Persister-Zellen: molekulare Grundlagen und klinische Relevanz*. BIOSpektrum, 2013. **19**(3): p. 250-252.
65. Cabral, D.J., J.I. Wurster, and P. Belenky, *Antibiotic Persistence as a Metabolic Adaptation: Stress, Metabolism, the Host, and New Directions*. Pharmaceuticals (Basel), 2018. **11**(1).
66. Balaban, N.Q., et al., *Bacterial persistence as a phenotypic switch*. Science, 2004. **305**(5690): p. 1622-5.
67. Hansen, S., et al., *Regulation of the Escherichia coli HipBA toxin-antitoxin system by proteolysis*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39185.
68. Hoiby, N. and C. Koch, *Cystic fibrosis. I. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis and its management*. Thorax, 1990. **45**(11): p. 881-4.
69. Conlon, B.P., *Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in S. aureus disease*. Bioessays, 2014. **36**(10): p. 991-6.
70. Ventola, C.L., *The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats*. P T, 2015. **40**(4): p. 277-83.
71. Petti, C.A. and V.G. Fowler, Jr., *Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis*. Cardiol Clin, 2003. **21**(2): p. 219-33, vii.

72. Davis, S.C., et al., *Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo*. *Wound Repair Regen*, 2008. **16**(1): p. 23-9.
73. Otto, M., *Staphylococcal biofilms*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008. **322**: p. 207-28.
74. Schommer, N.N., et al., *Staphylococcus epidermidis uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1*. *Infect Immun*, 2011. **79**(6): p. 2267-76.
75. Gristina, A.G., et al., *Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance*. *Biomaterials*, 1987. **8**(6): p. 423-6.
76. Keren, I., et al., *Persister cells and tolerance to antimicrobials*. *FEMS Microbiol Lett*, 2004. **230**(1): p. 13-8.
77. Que, Y.A. and P. Moreillon, *Infective endocarditis*. *Nat Rev Cardiol*, 2011. **8**(6): p. 322-36.
78. Fowler, V.G., Jr., et al., *Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress*. *JAMA*, 2005. **293**(24): p. 3012-21.
79. Schlievert, P.M., et al., *Identification and characterization of an exotoxin from Staphylococcus aureus associated with toxic-shock syndrome*. *J Infect Dis*, 1981. **143**(4): p. 509-16.
80. Herrera, A., et al., *Staphylococcal beta-Toxin Modulates Human Aortic Endothelial Cell and Platelet Function through Sphingomyelinase and Biofilm Ligase Activities*. *MBio*, 2017. **8**(2).
81. Cox, D., S.W. Kerrigan, and S.P. Watson, *Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(6): p. 1097-107.
82. Zilberszac, R., et al., *Role of a heart valve clinic programme in the management of patients with aortic stenosis*. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2017. **18**(2): p. 138-144.
83. Otto, C.M. and B. Prendergast, *Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(8): p. 744-56.
84. Iung, B., et al., *Recommendations on the management of the asymptomatic patient with valvular heart disease*. *Eur Heart J*, 2002. **23**(16): p. 1253-66.
85. Goland, S., et al., *Assessment of aortic stenosis by three-dimensional echocardiography: an accurate and novel approach*. *Heart*, 2007. **93**(7): p. 801-7.
86. Baumgartner, H., et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*. *Eur Heart J*, 2017. **38**(36): p. 2739-2791.
87. Lancellotti, P., L. Davin, and R. Dulgheru, *Aortic Stenosis Grading and Outcome: New Categories, New Therapeutic Challenges*. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2016. **9**(11): p. 1264-1266.
88. Herrmann, H.C., et al., *Predictors of mortality and outcomes of therapy in low-flow severe aortic stenosis: a Placement of Aortic Transcatheter Valves (PARTNER) trial analysis*. *Circulation*, 2013. **127**(23): p. 2316-26.
89. Nishimura, R.A., et al., *2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **70**(2): p. 252-289.
90. Vahanian, A., et al., *Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012. **42**(4): p. S1-44.
91. Nishimura, R.A., et al., *2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(22): p. 2438-88.
92. Clavel, M.A., et al., *Outcome of patients with aortic stenosis, small valve area, and low-flow, low-gradient despite preserved left ventricular ejection fraction*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(14): p. 1259-67.
93. Maes, F., et al., *Natural history of paradoxical low-gradient severe aortic stenosis*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2014. **7**(4): p. 714-22.

94. Jander, N., et al., *Outcome of patients with low-gradient "severe" aortic stenosis and preserved ejection fraction*. *Circulation*, 2011. **123**(8): p. 887-95.
95. Vinco, G., et al., *Meta-analysis of the outcome of patients with low gradient severe aortic stenosis and preserved left ventricular ejection fraction*. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(5): p. 5076-8.
96. Chambers, J.B., *Aortic stenosis*. *Eur J Echocardiogr*, 2009. **10**(1): p. i11-9.
97. Said, S.M., et al., *Outcomes of surgery for infective endocarditis: a single-centre experience of 801 patients*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2017.
98. Habib, G., et al., *Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(19): p. 2369-413.
99. Habib, G., et al., *[2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis]*. *Kardiol Pol*, 2015. **73**(11): p. 963-1027.
100. Liu, J.Z., et al., *Surgical treatment of active native mitral infective endocarditis: A meta-analysis of current evidence*. *J Chin Med Assoc*, 2017.
101. Murdoch, D.R., et al., *Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study*. *Arch Intern Med*, 2009. **169**(5): p. 463-73.
102. Thuny, F., et al., *Risk of embolism and death in infective endocarditis: prognostic value of echocardiography: a prospective multicenter study*. *Circulation*, 2005. **112**(1): p. 69-75.
103. Holland, T.L., et al., *Infective endocarditis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16059.
104. Falk, V., et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2017. **52**(4): p. 616-664.
105. Lalani, T., et al., *In-hospital and 1-year mortality in patients undergoing early surgery for prosthetic valve endocarditis*. *JAMA Intern Med*, 2013. **173**(16): p. 1495-504.
106. Mylonakis, E. and S.B. Calderwood, *Infective endocarditis in adults*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(18): p. 1318-30.
107. Voldstedlund, M., et al., *Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis*. *APMIS*, 2008. **116**(3): p. 190-8.
108. Brandao, T.J., et al., *Histopathology of valves in infective endocarditis, diagnostic criteria and treatment considerations*. *Infection*, 2017. **45**(2): p. 199-207.
109. Zauner, F., et al., *Are histopathological findings of diagnostic value in native valve endocarditis?* *Infection*, 2013. **41**(3): p. 637-43.
110. Greub, G., et al., *Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery*. *Am J Med*, 2005. **118**(3): p. 230-8.
111. Harris, K.A., et al., *Service evaluation to establish the sensitivity, specificity and additional value of broad-range 16S rDNA PCR for the diagnosis of infective endocarditis from resected endocardial material in patients from eight UK and Ireland hospitals*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014. **33**(11): p. 2061-6.
112. Kemp, M., et al., *Advantages and limitations of ribosomal RNA PCR and DNA sequencing for identification of bacteria in cardiac valves of danish patients*. *Open Microbiol J*, 2013. **7**: p. 146-51.
113. Bosshard, P.P., et al., *Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience*. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(2): p. 167-72.
114. Li, J.S., et al., *Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis*. *Clin Infect Dis*, 2000. **30**(4): p. 633-8.
115. Schoenenberger, A.W., et al., *Improvement of Risk Prediction After Transcatheter Aortic Valve Replacement by Combining Frailty With Conventional Risk Scores*. *JACC Cardiovasc Interv*, 2018. **11**(4): p. 395-403.
116. Gogbashian, A., A. Sedrakyan, and T. Treasure, *EuroSCORE: a systematic review of international performance*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004. **25**(5): p. 695-700.
117. Siregar, S., et al., *Performance of the original EuroSCORE*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012. **41**(4): p. 746-54.

118. Metzler, B. and B. Winkler, *SYNTAX, STS and EuroSCORE - how good are they for risk estimation in atherosclerotic heart disease?* *Thromb Haemost*, 2012. **108**(6): p. 1065-71.
119. Nashef, S.A., et al., *European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE)*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1999. **16**(1): p. 9-13.
120. Kuck, K.H. and C. Hamm, *Executive summary of the position paper of the German Cardiac Society on quality criteria for the implementation of transcatheter aortic valve implantation (TAVI)*. *Eur Heart J*, 2015. **36**(6): p. 328-30.
121. Balan, P., et al., *The Society of Thoracic Surgery Risk Score as a Predictor of 30-Day Mortality in Transcatheter vs Surgical Aortic Valve Replacement: A Single-Center Experience and its Implications for the Development of a TAVR Risk-Prediction Model*. *J Invasive Cardiol*, 2017. **29**(3): p. 109-114.
122. Von Reyn, C.F., et al., *Infective endocarditis: an analysis based on strict case definitions*. *Ann Intern Med*, 1981. **94**(4 pt 1): p. 505-18.
123. Lepidi, H., et al., *Autoimmunohistochemistry: a new method for the histologic diagnosis of infective endocarditis*. *J Infect Dis*, 2006. **193**(12): p. 1711-7.
124. Morris, A.J., et al., *Gram stain, culture, and histopathological examination findings for heart valves removed because of infective endocarditis*. *Clin Infect Dis*, 2003. **36**(6): p. 697-704.
125. Wang, S., F. Xu, and U. Demirci, *Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings*. *Biotechnol Adv*, 2010. **28**(6): p. 770-81.
126. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
127. Purcell, R.V., et al., *Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis**. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 34554.
128. Liu, Y.Y., et al., *Development of fluorogenic probe-based and high-resolution melting-based polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae**. *J Microbiol Methods*, 2017. **138**: p. 30-36.
129. Regueiro, A., et al., *Association Between Transcatheter Aortic Valve Replacement and Subsequent Infective Endocarditis and In-Hospital Death*. *JAMA*, 2016. **316**(10): p. 1083-92.
130. Olsen, N.T., et al., *Prosthetic valve endocarditis after transcatheter aortic valve implantation*. *Circ Cardiovasc Interv*, 2015. **8**(4).
131. Hill, E.E., et al., *Management of prosthetic valve infective endocarditis*. *Am J Cardiol*, 2008. **101**(8): p. 1174-8.
132. Khardori, N., *Future of diagnostic microbiology*. *Indian J Med Microbiol*, 2014. **32**(4): p. 371-7.
133. Isenberg, H.D., *Clinical microbiology: past, present, and future*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(3): p. 917-8.
134. Sharma, K., et al., *Advances and applications of molecular cloning in clinical microbiology*. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2014. **30**(1-2): p. 65-78.
135. Subedi, S., Z. Jennings, and S.C. Chen, *Laboratory Approach to the Diagnosis of Culture-Negative Infective Endocarditis*. *Heart Lung Circ*, 2017. **26**(8): p. 763-771.
136. Siciliano, R.F., et al., *Community-acquired culture-negative endocarditis: clinical characteristics and risk factors for mortality*. *Int J Infect Dis*, 2014. **25**: p. 191-5.
137. Katsouli, A. and M.G. Massad, *Current issues in the diagnosis and management of blood culture-negative infective and non-infective endocarditis*. *Ann Thorac Surg*, 2013. **95**(4): p. 1467-74.
138. Fukui, Y., et al., *Metagenomic analysis for detecting pathogens in culture-negative infective endocarditis*. *J Infect Chemother*, 2015. **21**(12): p. 882-4.
139. Ocampo, P.S., et al., *Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58**(8): p. 4573-82.
140. Shapira, N., et al., *Latent infective endocarditis: epidemiology and clinical characteristics of patients with unsuspected endocarditis detected after elective valve replacement*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **78**(5): p. 1623-9.
141. Ghidoni, J.J., *Role of *Bartonella henselae* endocarditis in the nucleation of aortic valvular calcification*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **77**(2): p. 704-6.

142. Peery, T.M. and J.M. Evans, *Brucellosis and heart disease. III. Chronic valvular heart disease following nonfatal brucellosis*. Ann Intern Med, 1958. **49**(3): p. 568-79.
143. van Kats, J.P., et al., *Microbiological examination of donated human cardiac tissue in heart valve banking*. Eur J Cardiothorac Surg, 2010. **37**(1): p. 163-9.
144. Erriu, M., et al., *Microbial biofilm modulation by ultrasound: current concepts and controversies*. Ultrason Sonochem, 2014. **21**(1): p. 15-22.
145. Scherr, T.D., et al., *Staphylococcus aureus Biofilms Induce Macrophage Dysfunction Through Leukocidin AB and Alpha-Toxin*. MBio, 2015. **6**(4).
146. Rosini, R. and I. Margarit, *Biofilm formation by Streptococcus agalactiae: influence of environmental conditions and implicated virulence factors*. Front Cell Infect Microbiol, 2015. **5**: p. 6.
147. Dunny, G.M., L.E. Hancock, and N. Shankar, *Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease*, in *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M.S. Gilmore, et al., Editors. 2014: Boston.
148. Pantaleon, V., et al., *Clostridium difficile forms variable biofilms on abiotic surface*. Anaerobe, 2018.
149. Tyner, H. and R. Patel, *Propionibacterium acnes biofilm - A sanctuary for Staphylococcus aureus?* Anaerobe, 2016. **40**: p. 63-7.
150. Kobayashi, H., et al., *Improved detection of biofilm-formative bacteria by vortexing and sonication: a pilot study*. Clin Orthop Relat Res, 2009. **467**(5): p. 1360-4.
151. Bonkat, G., et al., *Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication*. World J Urol, 2011. **29**(1): p. 133-8.
152. Pitt, W.G., *Removal of oral biofilm by sonic phenomena*. Am J Dent, 2005. **18**(5): p. 345-52.
153. Bigelow, T.A., et al., *The destruction of Escherichia coli biofilms using high-intensity focused ultrasound*. Ultrasound Med Biol, 2009. **35**(6): p. 1026-31.
154. Skowasch, D., et al., *Persistence of Chlamydia pneumoniae in degenerative aortic valve stenosis indicated by heat shock protein 60 homologues*. J Heart Valve Dis, 2003. **12**(1): p. 68-75.
155. Thornton, B. and C. Basu, *Rapid and simple method of qPCR primer design*. Methods Mol Biol, 2015. **1275**: p. 173-9.
156. Pierri, H., et al., *Density of Chlamydia pneumoniae is increased in fibrotic and calcified areas of degenerative aortic stenosis*. Int J Cardiol, 2006. **108**(1): p. 43-7.
157. Turgeman, Y., et al., *Adult calcific aortic stenosis and Chlamydia pneumoniae: the role of Chlamydia infection in valvular calcification*. Isr Med Assoc J, 2006. **8**(7): p. 464-8.
158. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 619-26.
159. Mendonca, V.R. and M. Barral-Netto, *Immunoregulation in human malaria: the challenge of understanding asymptomatic infection*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2015. **110**(8): p. 945-55.
160. Siegman-Igra, Y., *Infective endocarditis following gastrointestinal and genitourinary procedures: an argument in favour of prophylaxis*. Scand J Infect Dis, 2010. **42**(3): p. 208-14.
161. Lacassin, F., et al., *Procedures associated with infective endocarditis in adults. A case control study*. Eur Heart J, 1995. **16**(12): p. 1968-74.
162. Amat-Santos, I.J., et al., *Infective endocarditis after transcatheter aortic valve implantation: results from a large multicenter registry*. Circulation, 2015. **131**(18): p. 1566-74.
163. Wilbring, M., et al., *Surgery for fulminant prosthetic valve endocarditis after transapical transcatheter aortic valve-in-valve implantation*. Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **62**(1): p. 80-2.
164. Cacoub, P., et al., *Pacemaker infective endocarditis*. Am J Cardiol, 1998. **82**(4): p. 480-4.
165. Chalupova, M., et al., *Bacterial DNA detected on pathologically changed heart valves using 16S rRNA gene amplification*. Folia Microbiol (Praha), 2018.

166. Scerbo, M.H., et al., *Beyond Blood Culture and Gram Stain Analysis: A Review of Molecular Techniques for the Early Detection of Bacteremia in Surgical Patients*. Surg Infect (Larchmt), 2016. **17**(3): p. 294-302.
167. Comparato, G., et al., *Diverticular disease in the elderly*. Dig Dis, 2007. **25**(2): p. 151-9.
168. Akuzawa, N., et al., *Multiple liver abscesses and bacteremia caused by Streptococcus constellatus infection: a case report*. Clin Case Rep, 2017. **5**(1): p. 69-74.
169. Opota, O., et al., *Bacteremia caused by Comamonas kerstersii in a patient with diverticulosis*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(3): p. 1009-12.
170. Yahav, D., et al., *Bloodstream infections in older patients*. Virulence, 2016. **7**(3): p. 341-52.
171. Perez-Chaparro, P.J., et al., *[Bacteremia of oral origin]*. Rev Stomatol Chir Maxillofac, 2011. **112**(5): p. 300-3.
172. Lockhart, P.B., et al., *Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction*. Circulation, 2008. **117**(24): p. 3118-25.
173. Zweng, I., et al., *Transcatheter versus Surgical Aortic Valve Replacement in High-risk Patients: A propensity-score matched analysis*. Heart Lung Circ, 2016. **25**(7): p. 661-7.
174. Thielmann, M., et al., *New techniques for the treatment of valvular aortic stenosis-- transcatheter aortic valve implantation with the SAPIEN heart valve*. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2009. **18**(3): p. 131-41.
175. Telila, T., E. Mohamed, and K.M. Jacobson, *Endovascular Therapy for Rheumatic Mitral and Aortic Valve Disease: Review Article*. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2018. **20**(7): p. 59.
176. Pasipoularides, A., *Calcific Aortic Valve Disease: Part 1--Molecular Pathogenetic Aspects, Hemodynamics, and Adaptive Feedbacks*. J Cardiovasc Transl Res, 2016. **9**(2): p. 102-18.
177. Lepidi, H., et al., *Quantitative histological examination of bioprosthetic heart valves*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(5): p. 590-6.
178. Smith, C.J. and A.M. Osborn, *Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology*. FEMS Microbiol Ecol, 2009. **67**(1): p. 6-20.
179. Azzari, C., et al., *Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9282.
180. Sanchez, M.C., et al., *Analysis of viable vs. dead Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis using selective quantitative real-time PCR with propidium monoazide*. J Periodontal Res, 2013. **48**(2): p. 213-20.
181. Baumgartner, H., et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the Management of Valvular Heart Disease*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2018. **71**(2): p. 110.
182. Cunningham, M.W., *Pathogenesis of group A streptococcal infections*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(3): p. 470-511.
183. Binotto, M., L. Guilherme, and A. Tanaka, *Rheumatic Fever*. Images Paediatr Cardiol, 2002. **4**(2): p. 12-31.
184. Inoue, K., et al., *A complication of meningitis and infective endocarditis due to Streptococcus pyogenes*. BMJ Case Rep, 2017. **2017**.
185. Yesilkaya, A., et al., *A Rare Cause of Endocarditis: Streptococcus pyogenes*. Balkan Med J, 2012. **29**(3): p. 331-3.
186. Weidman, D.R., H. Al-Hashami, and S.K. Morris, *Two cases and a review of Streptococcus pyogenes endocarditis in children*. BMC Pediatr, 2014. **14**: p. 227.
187. Lawrence, J.G., et al., *Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: incidence and progression in the Northern Territory of Australia, 1997 to 2010*. Circulation, 2013. **128**(5): p. 492-501.
188. Bright, P.D., B.M. Mayosi, and W.J. Martin, *An immunological perspective on rheumatic heart disease pathogenesis: more questions than answers*. Heart, 2016. **102**(19): p. 1527-32.
189. Fae, K.C., et al., *How an autoimmune reaction triggered by molecular mimicry between streptococcal M protein and cardiac tissue proteins leads to heart lesions in rheumatic heart disease*. J Autoimmun, 2005. **24**(2): p. 101-9.

190. Guilherme, L., et al., *Rheumatic fever: how S. pyogenes-primed peripheral T cells trigger heart valve lesions*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1051**: p. 132-40.
191. Guilherme, L., et al., *Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins*. Circulation, 1995. **92**(3): p. 415-20.
192. Terico, A.T. and J.C. Gallagher, *Beta-lactam hypersensitivity and cross-reactivity*. J Pharm Pract, 2014. **27**(6): p. 530-44.
193. Chopra, P. and H. Gulwani, *Pathology and pathogenesis of rheumatic heart disease*. Indian J Pathol Microbiol, 2007. **50**(4): p. 685-97.
194. Marijon, E., et al., *Rheumatic heart disease*. Lancet, 2012. **379**(9819): p. 953-64.
195. Grifone, J.W. and J.R. Kitchell, *Active rheumatic heart disease in patients over sixty*. J Am Med Assoc, 1954. **154**(16): p. 1341-3.
196. Martin, J., *The Streptococcus pyogenes Carrier State*, in *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*, J.J. Ferretti, D.L. Stevens, and V.A. Fischetti, Editors. 2016: Oklahoma City (OK).
197. Mann, W., *Experimental tympanosclerosis following infection with Streptococcus pyogenes and vitamin D3 intoxication*. Arch Otorhinolaryngol, 1986. **243**(5): p. 296-303.
198. Waltersdorff, R.L., B.A. Fiedel, and R.W. Jackson, *Induction of nephrocalcinosis in rabbit kidneys after long-term exposure to a streptococcal teichoic acid*. Infect Immun, 1977. **17**(3): p. 665-7.
199. Gibofsky, A., S. Kerwar, and J.B. Zabriskie, *Rheumatic fever. The relationships between host, microbe, and genetics*. Rheum Dis Clin North Am, 1998. **24**(2): p. 237-59.
200. Figueroa, F.E., et al., *[Presence of bacterial DNA in valvular tissue of patients with chronic rheumatic heart disease]*. Rev Med Chil, 2007. **135**(8): p. 959-66.
201. Achermann, Y., et al., *Propionibacterium acnes: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(3): p. 419-40.
202. Perry, A. and P. Lambert, *Propionibacterium acnes: infection beyond the skin*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. **9**(12): p. 1149-56.
203. Scholz, C.F. and M. Kilian, *The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus Propionibacterium to the proposed novel genera Acidipropionibacterium gen. nov., Cutibacterium gen. nov. and Pseudopropionibacterium gen. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2016. **66**(11): p. 4422-4432.
204. Drosch, T., M. Egle, and L. Zabel, *[Endocarditis caused by Propionibacterium acnes -- a diagnostic and therapeutic challenge]*. Dtsch Med Wochenschr, 2013. **138**(9): p. 418-20.
205. Sohail, M.R., et al., *Infective endocarditis due to Propionibacterium species*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(4): p. 387-94.
206. Banzon, J.M., et al., *Propionibacterium acnes endocarditis: a case series*. Clin Microbiol Infect, 2017. **23**(6): p. 396-399.
207. Hussain, A., N. Nasir, and B. Jamil, *An Unusual Pathogen Causing Native Valve Endocarditis*. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2016. **28**(4): p. 824-825.
208. Sanclement, J.A., et al., *Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis*. Laryngoscope, 2005. **115**(4): p. 578-82.
209. Dlugaszewska, J., et al., *The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2016. **273**(8): p. 1989-94.
210. Calo, L., et al., *Role of biofilms in chronic inflammatory diseases of the upper airways*. Adv Otorhinolaryngol, 2011. **72**: p. 93-6.
211. Jahns, A.C., H. Eilers, and O.A. Alexeyev, *Transcriptomic analysis of Propionibacterium acnes biofilms in vitro*. Anaerobe, 2016. **42**: p. 111-118.
212. Yamamoto, R., et al., *Silent Native-valve Endocarditis Caused by Propionibacterium acnes*. Intern Med, 2018.
213. Both, A., et al., *Growth of Cutibacterium acnes is common on osteosynthesis material of the shoulder in patients without signs of infection*. Acta Orthop, 2018: p. 1-5.
214. Fisher, K. and C. Phillips, *The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 6): p. 1749-57.

215. Karygianni, L., et al., *Enterococcus faecalis* affects the proliferation and differentiation of ovine osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig*, 2012. **16**(3): p. 879-87.
216. Dale, J.L., et al., *Restructuring of Enterococcus faecalis* biofilm architecture in response to antibiotic-induced stress. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2017. **3**: p. 15.
217. Goh, H.M.S., et al., *Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection*. *Virulence*, 2017. **8**(8): p. 1525-1562.
218. Hallgren, A., et al., *Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of Enterococcus faecalis and E. faecium of clinical origin*. *Int J Med Microbiol*, 2009. **299**(5): p. 323-32.
219. Vogkou, C.T., et al., *The causative agents in infective endocarditis: a systematic review comprising 33,214 cases*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016. **35**(8): p. 1227-45.
220. Streckfuss, J.L., et al., *Calcification of selected strains of streptococci*. *J Dent Res*, 1979. **58**(9): p. 1916-7.
221. Cai, T., et al., *Prostate calcifications: A case series supporting the microbial biofilm theory*. *Investig Clin Urol*, 2018. **59**(3): p. 187-193.
222. Mazzoli, S., *Biofilms in chronic bacterial prostatitis (NIH-II) and in prostatic calcifications*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010. **59**(3): p. 337-44.
223. Ike, Y., *Pathogenicity of Enterococci*. *Nihon Saikingaku Zasshi*, 2017. **72**(2): p. 189-211.
224. Sava, I.G., E. Heikens, and J. Huebner, *Pathogenesis and immunity in enterococcal infections*. *Clin Microbiol Infect*, 2010. **16**(6): p. 533-40.
225. Egido, S.H., et al., *Enterococcus faecium small colony variant endocarditis in an immunocompetent patient*. *New Microbes New Infect*, 2016. **9**: p. 47-9.
226. Kim, E.B. and M.L. Marco, *Nonclinical and clinical Enterococcus faecium strains, but not Enterococcus faecalis strains, have distinct structural and functional genomic features*. *Appl Environ Microbiol*, 2014. **80**(1): p. 154-65.
227. Chang, F.Y., et al., *A prospective multicenter study of Staphylococcus aureus bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance*. *Medicine (Baltimore)*, 2003. **82**(5): p. 322-32.
228. Gudiol, F., et al., *Diagnosis and treatment of bacteremia and endocarditis due to Staphylococcus aureus. A clinical guideline from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC)*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2015. **33**(9): p. 625 e1-625 e23.
229. Wang, A., et al., *The use and effect of surgical therapy for prosthetic valve infective endocarditis: a propensity analysis of a multicenter, international cohort*. *Am Heart J*, 2005. **150**(5): p. 1086-91.
230. Habib, G., et al., *Prosthetic valve endocarditis: who needs surgery? A multicentre study of 104 cases*. *Heart*, 2005. **91**(7): p. 954-9.
231. Wang, A., J.G. Gaca, and V.H. Chu, *Management Considerations in Infective Endocarditis: A Review*. *JAMA*, 2018. **320**(1): p. 72-83.
232. Abdelhady, W., et al., *Impact of vancomycin on sarA-mediated biofilm formation: role in persistent endovascular infections due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 2014. **209**(8): p. 1231-40.
233. Josse, J., F. Laurent, and A. Diot, *Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms*. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 2433.
234. Bonar, E., I. Wojcik, and B. Wladyka, *Proteomics in studies of Staphylococcus aureus virulence*. *Acta Biochim Pol*, 2015. **62**(3): p. 367-81.
235. Osterdal, O.B., et al., *Cardiac surgery for infective endocarditis in patients with intravenous drug use*. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2016. **22**(5): p. 633-40.
236. Asgeirsson, H., A. Thalme, and O. Weiland, *Staphylococcus aureus bacteraemia and endocarditis - epidemiology and outcome: a review*. *Infect Dis (Lond)*, 2018. **50**(3): p. 175-192.
237. Abdallah, L., et al., *Comparison of prognoses of Staphylococcus aureus left-sided prosthetic endocarditis and prosthetic endocarditis caused by other pathogens*. *Arch Cardiovasc Dis*, 2016. **109**(10): p. 542-549.
238. Sohail, M.R., et al., *Medical versus surgical management of Staphylococcus aureus prosthetic valve endocarditis*. *Am J Med*, 2006. **119**(2): p. 147-54.

239. Georgescu, A.M., et al., *Fatal endocarditis with methicilin-sensible Staphylococcus aureus and major complications: rhabdomyolysis, pericarditis, and intracerebral hematoma: A case report and review of the literature*. *Medicine (Baltimore)*, 2016. **95**(41): p. e5125.
240. Fernandez Guerrero, M.L., et al., *Endocarditis caused by Staphylococcus aureus: A reappraisal of the epidemiologic, clinical, and pathologic manifestations with analysis of factors determining outcome*. *Medicine (Baltimore)*, 2009. **88**(1): p. 1-22.
241. Szafranska, A.K., et al., *High-resolution transcriptomic analysis of the adaptive response of Staphylococcus aureus during acute and chronic phases of osteomyelitis*. *MBio*, 2014. **5**(6).
242. Bosi, E., et al., *Comparative genome-scale modelling of Staphylococcus aureus strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(26): p. E3801-9.
243. Recker, M., et al., *Clonal differences in Staphylococcus aureus bacteraemia-associated mortality*. *Nat Microbiol*, 2017. **2**(10): p. 1381-1388.
244. Plata, K., A.E. Rosato, and G. Wegrzyn, *Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity*. *Acta Biochim Pol*, 2009. **56**(4): p. 597-612.
245. Salgado-Pabon, W., et al., *Superantigens are critical for Staphylococcus aureus Infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury*. *MBio*, 2013. **4**(4).
246. Waters, E.M., et al., *Convergence of Staphylococcus aureus Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells?* *PLoS Pathog*, 2016. **12**(12): p. e1006012.
247. Soavelomandroso, A.P., et al., *Biofilm Structures in a Mono-Associated Mouse Model of Clostridium difficile Infection*. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 2086.
248. Awad, M.M., et al., *Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen*. *Gut Microbes*, 2014. **5**(5): p. 579-93.
249. Brook, I., *Infective endocarditis caused by anaerobic bacteria*. *Arch Cardiovasc Dis*, 2008. **101**(10): p. 665-76.
250. Zhang, Y., et al., *Cysteine Protease-Mediated Autocleavage of Clostridium difficile Toxins Regulates Their Proinflammatory Activity*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018. **5**(4): p. 611-625.
251. Aktories, K., C. Schwan, and T. Jank, *Clostridium difficile Toxin Biology*. *Annu Rev Microbiol*, 2017. **71**: p. 281-307.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertationsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr.Dr.Dr. Andreas Oberbach für die Betreuung dieser Arbeit, seine tatkräftige Unterstützung und unendliche Geduld und vor allem für die unglaublich kompetente fachliche Betreuung. Die zahlreichen Gespräche über gutes wissenschaftliches Arbeiten sowie die Diskussion dieses spannenden Themas werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Außerdem danke ich seinen Mitarbeiterinnen Dr. Stefanie Lehmann, Dr. Nadine Schlichting und Dr. Yvonne Kullnick für die großartige Arbeit im Labor des Fraunhoferinstituts in Leipzig.

Herrn Prof. Christian Hagl danke ich für die Möglichkeit an der Herzchirurgischen Poliklinik promovieren zu dürfen und damit auch zahlreiche Einblicke in das klinische Tätigkeitsfeld der Herzchirurgie zu erhalten.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Freund Martin, für seine nicht endende Geduld und Unterstützung in allen Höhen und Tiefen, die mit der Anfertigung dieser Doktorarbeit verbunden waren.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich nicht nur finanziell immer unterstützt haben und mir damit die Möglichkeit gaben, mich ausschließlich auf mein Studium zu konzentrieren, sondern auch mein ganzes Leben an mich geglaubt und mich in all meinen Träumen und Entscheidungen bestärkt haben. Ich bin euch unendlich dankbar für Alles - Tati, du wirst immer in meinem Herzen bleiben!

# Eidesstattliche Versicherung

**Alber, Marion**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Infektiöse Pathogenese der Aortenklappenstenose  
Welche Rolle spielen Bakterien in der Entwicklung struktureller  
Herzklappenerkrankungen?**

Selbstständig erfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft, unter Bezeichnung der Fundstelle, einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12.12.2020  
Ort, Datum

Marion Alber