

Diplomarbeit

**Methoden der Erregerdiagnostik in der Augenheilkunde
von der Kultur über PCR bis hin zu Next Generation
Sequencing**

eingereicht von

Mathias Mairitsch

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitäts-Augenklinik Graz

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Dr. med. univ. Andreas Wedrich

und

Univ. FA Dr. med. univ. Michael Sommer

Graz, am 03.08.2023

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, am 03.08.2023

Mathias Mairitsch eh.

Danksagungen

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Univ.- Prof. Dr. med. univ. Andreas Wedrich und Herrn Univ. FA Dr. med. univ. Michael Sommer für die außerordentlich gute Betreuung und Unterstützung bei meiner Diplomarbeit bedanken. Die häufigen Besprechungen und professionellen Hilfestellungen haben maßgeblich zur Vollendung meiner Arbeit beigetragen.

Zusätzlich gebührt mein Dank meiner Familie, die mich während des Studiums bedingungslos unterstützt hat, mir mit Rat und Tat beiseite stand und mir ein sorgloses Studium ermöglicht hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freund*innen und Wegbegleiter*innen bedanken, ohne die das Studium nur halb so viel Spaß gemacht hätte.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	1
Abkürzungen und deren Erklärung.....	3
Zusammenfassung	4
Abstract.....	6
1 Einleitung	7
1.1 Keratitis.....	7
1.1.1 Bakterielle Keratitis	7
1.1.2 Mykotische Keratitis	11
1.1.3 Viruskeratitis	13
1.1.4 Protozoenkeratitis	18
1.2 Endophthalmitis	20
1.2.1 Endogene Endophthalmitis.....	20
1.2.2 Exogene Endophthalmitis.....	23
1.3 Kultivierung von Mikroorganismen	27
1.3.1 Probengewinnung	27
1.3.2 Von der Bebrütung zur Auswertung.....	28
1.3.3 Nährböden	29
1.4 Polymerase Kettenreaktion	29
1.4.1 Ablauf der PCR	30
1.4.2 Varianten der PCR.....	30
1.5 Next Generation Sequencing	31
1.5.1 Sequenzierung der ersten Generation	32
1.5.2 Sequenzierung der zweiten Generation	32
1.5.3 Sequenzierung der dritten Generation	33
2 Material und Methoden	35
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Erregerdiagnostik bei Keratitis	37
3.1.1 Kultur.....	37
3.1.2 PCR.....	41
3.1.3 Next Generation Sequencing.....	42
3.1.4 Vergleich der Diagnostikmethoden.....	43
3.1.5 Schlussfolgerungen.....	48
3.2 Erregerdiagnostik bei Endophthalmitis	50
3.2.1 Kultur.....	50
3.2.2 PCR.....	54
3.2.3 Next Generation Sequencing.....	55
3.2.4 Vergleich der Diagnostikmethoden.....	57
3.2.5 Schlussfolgerungen.....	61
4 Diskussion	62
Literaturverzeichnis	66

Abkürzungen und deren Erklärung

PCR.....	Polymerasekettenreaktion
dPCR.....	digitale Polymerasekettenreaktion
qPCR.....	quantitative Polymerasekettenreaktion
rtPCR.....	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
nPCR.....	nested Polymerasekettenreaktion
OCT.....	Optische Kohärenztomographie
NGS.....	Next Generation Sequencing
ddNTP.....	Didesoxynukleosidtriphosphat
ddATP.....	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP.....	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP.....	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP.....	Didesoxythymidintriphosphat
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
RNA.....	Ribonukleinsäure
rRNA.....	ribosomale Ribonukleinsäure
E. coli.....	Escherichia coli
IVCM.....	in vivo konfokale Mikroskopie
KOH.....	Kaliumhydroxid
IUSG.....	international uveitis study group

Zusammenfassung

Titel:

Methoden der Erregerdiagnostik in der Augenheilkunde
von der Kultur über PCR bis hin zu Next Generation Sequencing

Hintergrund:

Die Keratitis und die Endophthalmitis sind zwei bedrohliche Erkrankungen in der Ophthalmologie, die die Einleitung einer frühestmöglichen, adäquaten Therapie erfordern. Zur Diagnostik wird an den meisten Zentren bei Verdacht ein Abstrich bzw. eine Probe entnommen und anschließend eine Kultur angelegt oder eine PCR durchgeführt. Leider sind diese Diagnostikmethoden in vielen Fällen wenig sensitiv, trotzdem gelten sie bis heute als Goldstandard. Inzwischen gibt es jedoch modernere Verfahren wie die Next Generation Sequencing Methoden.

In dieser Diplomarbeit werden die drei Diagnostikmethoden einander gegenübergestellt und wertend verglichen.

Methoden:

Die Gegenüberstellung erfolgt anhand einer Literaturrecherche. Dazu wurden geeignete Suchbegriffe definiert, bei denen auf Synonyme geachtet wurde.

Alle Publikationen mit Aussagen oder konkreten Werten zur Sensitivität, Spezifität, Auswertungsdauer, Kosten oder Verfügbarkeit der Diagnostikmethoden wurden eingeschlossen. Des Weiteren wurde ein Filter gewählt, der die Suche auf die letzten fünf Jahre einschränkt, Tierstudien und Fallberichte wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die Suche hat zu 327 Ergebnissen geführt, von denen jeweils das Abstract auf Ein- und Ausschlusskriterien geprüft wurde. Am Ende blieben 30 Publikationen übrig, jeweils fünfzehn für Keratitis und fünfzehn für Endophthalmitis, die in der Arbeit behandelt werden.

Ergebnisse:

Sowohl bei der Keratitis als auch bei der Endophthalmitis ist NGS die sensitivste Diagnostikmethode. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Infektion auf Bakterien, Pilze oder Protozoen zurückzuführen ist. Die Spezifität wird für alle Diagnostikmethoden mit an

100% grenzenden Werten angegeben. Während die Auswertungsdauer von NGS und PCR nur wenige Stunden bis Tage dauert, ist die Auswertungsdauer der Kultur deutlich länger und benötigt je nach Erregerart und Keimzahl bis zu mehreren Wochen. Die Kosten sind für die Kultur am geringsten, PCR ist etwas teurer und NGS ist am kostspieligsten. Weiterhin bietet NGS die Möglichkeit, das ganze Augenmikrobiom in kurzer Zeit zu sequenzieren und analysieren.

Schlussfolgerung:

Die Kultur ist die kostengünstigste und im Zusammenspiel mit der Klinik der Patient*innen eine bewährte Diagnostikmethode. Es ist davon auszugehen, dass sie in naher Zukunft trotz ihrer vergleichsweise geringen Sensitivität der Goldstandard in der Diagnostik bleiben wird. Es gibt einige Ursachen wieso in der Kultur keine Erreger nachweisbar sind, wie beispielsweise eine niedrige Keimzahl in der Probe, schwer zu kultivierende Erreger wie Pseudomonas, eine Antibiotikabehandlung vor der Probenentnahme sowie die Gewebeart der Probe. In diesen Fällen wird in der untersuchten Literatur das Zurückgreifen auf PCR und NGS als Ergänzung vorgeschlagen. Noch besser wäre es, wenn die beiden sensitiveren Methoden direkt eingesetzt werden, beispielsweise indem die Entscheidung auf der Grundlage eines Algorithmus getroffen wird, der ebendiese Faktoren berücksichtigt. Die Möglichkeit von NGS das gesamte Augenmikrobiom in kürzester Zeit zu analysieren, ist aktuell Gegenstand weiterer Forschungen. Es bleibt offen, welchen diagnostischen Wert Veränderungen des Mikrobioms bei infektiösen Erkrankungen haben.

Abstract

- Titel:** Methods of pathogen diagnostics in ophthalmology - from culture via PCR to next generation sequencing
- Purpose:** Keratitis and endophthalmitis are two threatening diseases that require a quick diagnosis and adequate therapy as early as possible. Unfortunately, conventional diagnostic methods as culture and PCR often show a low sensitivity. There are modern techniques such as Next Generation Sequencing methods, that seem to provide more results. In this thesis, culture and PCR are compared to Next Generation Sequencing methods by an evaluation of their sensitivity, specificity, duration and costs.
- Methods:** The comparison is based on a literature search. For this purpose, suitable search terms were defined, with attention to synonyms. All publications with concrete values on sensitivity, specificity, evaluation time, costs or availability of the diagnostic methods were included. A filter was chosen to limit the search to the last five years, animal studies and case reports were excluded. The search yielded 327 results, of which the abstract of each was screened. In the end, 30 publications remained, fifteen each for keratitis and for endophthalmitis, that are discussed in the paper.
- Results:** For both keratitis and endophthalmitis, NGS is the most sensitive diagnostic method. Specificity is reported to be close to 100% for all diagnostic methods. While the evaluation time of NGS and PCR takes only a few hours to days, the evaluation time of culture is significantly longer and requires up to several weeks. The costs are lowest for culture, PCR is slightly more expensive, and NGS is most expensive. Furthermore, NGS offers the possibility to sequence and analyse the whole ocular microbiome in a short period of time.
- Conclusion:** Culture is the most cost-effective and in the clinical context a proven diagnostic method. It is expected that culture remains goldstandard for the next few years despite its comparatively low sensitivity. There are a few reasons why culture does not provide adequate results like low bacterial count, pathogens that are difficult to cultivate, or antibiotic treatment before sample collection and the sample type. In these cases, PCR and NGS could be used as supplements. It would be even better to use the more sensitive methods directly, for example by making the decision based on an algorithm including these factors.

1 Einleitung

1.1 Keratitis

Unter Keratitis versteht man die Entzündung der Hornhaut des Auges, die durch einen biologischen, chemischen, physikalischen oder mechanischen Reiz entstehen kann. Alle Schichten der Hornhaut können betroffen sein, tiefe und oberflächliche Schichten können auch isoliert betroffen sein. Man kann die Keratitis grob in infektiöse und nicht infektiöse Keratitis einteilen. Die nicht erregerbedingten Formen sind die Keratitis superficialis punctata, Keratitis neuroparalytica und Keratitis e lagophthalmo. Erregerbedingt sind die bakterielle Keratitis, Pilzkeratitis, Viruskeratitis und die Protozoenkeratitis.

Da diese Arbeit die Erregerdiagnostik behandelt, werden im Nachfolgenden die erregerbedingten Keratitiden erläutert. (1)

1.1.1 Bakterielle Keratitis

1.1.1.1 Definition

Die bakterielle Keratitis ist eine Infektion der Hornhaut, die durch Bakterien verursacht wird. Normalerweise schützt ein intaktes Hornhautepithel vor dem Eindringen von Bakterien, kleinere oberflächliche Epitheldefekte stellen jedoch eine Eintrittspforte für hochvirulente Bakterien dar. (1)

Des Weiteren können Bakterien wie *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae* und *Haemophilus influenzae* auch intaktes Hornhautepithel durchdringen. (2)

Sind Bakterien in die Hornhaut eingedrungen, läuft eine entzündliche Reaktion ab, Leukozyten wandern ein und ein Hornhautulkus entsteht. (1)

1.1.1.2 Epidemiologie

Laut WHO beträgt der Zusammenhang zwischen infektiöser Hornhauterkrankung und Erblindung 1,5-2 Millionen Fälle pro Jahr. (3) Die Prävalenz beläuft sich je nach Quelle

auf 6,3-700 pro 100.000 Einwohner (4) und unterscheidet sich aufgrund klimatischer und geographischer Gegebenheiten, sowie sozioökonomischen Faktoren. (5)

1.1.1.3 Risikofaktoren

Zu den häufigsten Risikofaktoren gehören unter anderem das Tragen von Kontaktlinsen, Traumata und Fremdkörper, chirurgische Eingriffe, Immunsuppression, Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus, Dakryozystitis und Tränenwegsverschlüsse. (6)

1.1.1.4 Erregerspektrum

Die häufigsten Erreger sind *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und Streptokokken.

Pseudomonas aeruginosa ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium, das vor allem im Gastrointestinaltrakt vorzufinden ist. (2) Die Infektion hat meist einen aggressiven, rasch progredienten Verlauf und ist häufig mit Kontaktlinsenträger*innen assoziiert.

Endophthalmitis ist eine häufige Komplikation. (1)

Staphylococcus aureus ist ein grampositives, koagulasepositives Bakterium, das im Nasenbereich, sowie auf der Haut und auf den Konjunktiven vorkommt. Die Infektion verläuft anfangs häufig mit unscharf begrenzten weißlichen oder gelblichen Infiltraten. Streptokokken kommen in den oberen Atemwegen, dem Rachen und in der Vagina vor. Der Verlauf ist meist sehr aggressiv. (2)

Zu den selteneren Keimen zählen *Moraxella lacunata*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* und *Treponema pallidum*. (1)

In 20-30 Prozent der Fälle können auch Mischinfektionen mit anderen Bakterienstämmen, Viren oder Pilzen vorliegen. (6)

1.1.1.5 Klinisches Erscheinungsbild

Die Klinik hängt vom Erreger ab und tritt grundsätzlich immer mit einer Konjunktivitis auf. Die häufigsten Symptome sind Photophobie, Schmerzen, verschwommenes Sehen, Lidkrampf, mukopurulenten oder purulenten Sekret und Ulzerationen. (7) In der

Spaltlampenuntersuchung können unter anderem Epitheldefekte mit Infiltrat und ziliarer Gefäßinjektion, Stromaödeme, Descement-Falten, (2) graue Läsionen mit wallartig aufgeworfenem, dichten Leukozytenrand beobachtet werden. Ein Hypopyon ist ebenfalls ein häufiger Befund. Zu den Komplikationen zählen das Ulkus serpens, das rasch progredient ist und zur Hornhauperforation führen kann, sowie eine Skleritis, oder Endophthalmitis. Ein bakterielles Hornhautulkus ist als Notfallsituation zu betrachten, da Erblindungsgefahr besteht. (1)

1.1.1.6 Diagnostik

Neben einer gründlichen Anamnese wird standardmäßig ein Abstrich durchgeführt und der Keim anschließend klassifiziert. Des Weiteren muss bei einem Hornhautulkus sofort auf ein aerobes und ein anaerobes Kulturmedium sowie ein Pilznährmedium, verimpft werden.

(1) Die Probe wird nach Applikation eines Lokalanästhetikums, zum Beispiel Proxymetacain 0,5 Prozent, mittels Hockeymesser, Kimura-Spatel, Subkutannadel, oder Skalpell durch Kürettage gewonnen. Lockerer Schleim und nekrotisches Gewebe müssen im Vorhinein vorsichtig entfernt werden, die Probe wird von Basis und Rändern der Läsion entnommen. Bei den Nährmedien handelt es sich standardmäßig um Blut-, Schokoladen- und Sabouraud-Agar. Zusätzlich sollten Abstriche der Konjunktiva und dem Augenlid durchgeführt werden, (8) sowie bei Kontaktlinsenträger*innen vom Kontaktlinsenaufbewahrungsbehälter, der Linsenflüssigkeit und den Linsen. Eine rasche Diagnostik mit Kultur und Antibiotika-Resistenztestung ist für eine zielführende Behandlung essenziell. (2)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist genauso eine praktizierte Diagnostikmethode (6) mit dem Vorteil, Erreger bei geringen Keimzahlen nachzuweisen. So eignet sie sich beispielsweise zur Detektion von *Pseudomonas aeruginosa*. (9) Die hohe Sensitivität kann aber auch zu falschen Ergebnissen führen, wenn die Probe anderwärtig kontaminiert wurde. Die PCR kommt auch zum Einsatz devitaler Erreger, wenn vorab Antibiotika eingesetzt wurden und das Anzüchten einer Kultur nicht mehr möglich ist.

1.1.1.7 Therapie

Da bei der bakteriellen Keratitis Erblindungsgefahr besteht, wird mit einer empirischen Breitband-Antibiotikatherapie begonnen, bevor die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung vorhanden sind. Diese erfolgt lokal und wird in Form von Tropfen 24 bis 48 Stunden lange, Tag und Nacht, stündlich appliziert. Einer antibiotischen Monotherapie steht eine Kombinationstherapie gegenüber. Die zu präferierende Therapieform ist in der Literatur unterschiedlich, eine Metaanalyse der zwei Optionen konnte keine Tendenz liefern. (10) Die Monotherapie hat den Vorteil einer geringeren Oberflächentoxizität, meist wird ein Fluorchinolon Präparat gewählt. Je nach geographischer Resistenzlage werden entweder Ciprofloxacin und Ofloxacin, oder Moxifloxacin und Gatifloxacin eingesetzt. (2) Die Kombinationstherapie ist die bevorzugte Wahl bei aggressiveren Varianten. Eine Studie aus Oxford gibt für die Kombination aus Cefuroxim und einem Aminoglykosid eine Wirkung von 99,5% an. (11)

Systemische Antibiotika sind nur bei systemischer Beteiligung, Sklerabeteiligung oder starker Hornhautausdünnung mit drohender Perforation indiziert. Bei der isolierten Keratitis ist die systemische Applikation nicht zielführend, da nur eine geringe Konzentration die Hornhaut erreicht. (1)

Neben der antibiotischen Therapie sollte eine Steroidtherapie zum Einsatz kommen, sofern eine Pilz-, Herpes-simplex Virus-, oder Mykobakterien-Keratitis ausgeschlossen wurde. Glukokortikoide hemmen die Entzündung, steigern das Wohlbefinden und reduzieren die Vernarbung. (2) Des Weiteren weisen Patient*innen, die eine rasche Steroid Therapie erhalten, bessere Visus-Ergebnisse auf als welche, die keine oder eine spätere Steroid Therapie erhalten. (12)

Mydriatika, zum Beispiel Atropin 1%, verhindern die Bildung von hinteren Synechien und lindern durch Cycloplegie den Schmerz.

Ergänzend muss noch bedacht werden, dass auf das Tragen von Kontaktlinsen verzichtet werden muss und dass ein Augenschutz bei Perforation zum Schutz des Auges angebracht werden kann. (2)

In schweren Fällen mit größerer Perforation ist eine operative Behandlung, eine Keratoplastik, anzustreben. Kleinere Perforationen werden mittels therapeutischer Kontaktlinse oder Gewebekleber versorgt. (1)

1.1.1.8 Prognose

Die Prognose ist abhängig von Ulkusgröße, Alter der Patient*innen, Erreger und Therapie. Die bakterielle Keratitis ist eine ernst zu nehmende Pathologie und bedarf raschen Handelns. (8)

1.1.2 Mykotische Keratitis

1.1.2.1 Definition

Die mykotische Keratitis ist eine Entzündung der Hornhaut des Auges, die durch einen Pilz ausgelöst wird. Während diese Infektion in gemäßigten Klimazonen selten ist, tritt sie in den Tropen und Entwicklungsländern häufig auf. Gleich wie bei der bakteriellen Keratitis besteht das Risiko zur Hornhautperforation, zum Visusverlust sowie Erblindungsgefahr. Die dominanten zwei Arten sind fadenförmige und hefeartige Pilze. (7)

1.1.2.2 Epidemiologie

In Asien ist die pilzbedingte Keratitis Hauptursache für Erblindungen, insgesamt macht sie bis zu 50% aller infektiösen Keratitiden aus. In gemäßigten Zonen wie in Europa beträgt die Rate meist weniger als 10%. (7) In Südindien und Nepal werden die höchsten Inzidenzen beschrieben. (13) Betroffen sind verhältnismäßig oft junge, männliche Landarbeiter.

1.1.2.3 Risikofaktoren

Die Langzeittherapie mit Steroiden, lokalen oder systemischen Antibiotika oder Immunsuppression gilt als Risikofaktoren für die mykotische Keratitis. Auch diverse Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Alkoholabusus, das Tragen von Kontaktlinsen oder chronische Erkrankungen der Augenoberfläche begünstigen das Auftreten. Des Weiteren können Traumata mit pflanzlichem Material prädisponierend sein. (14)

1.1.2.4 Erregerspektrum

Fadenpilze und Hefepilze lösen die mykotische Keratitis am häufigsten aus. Zu ersteren zählen Fusarium und Aspergillus, sie produzieren Hyphen und kommen eher in tropischen Gebieten vor. Der Verlauf ist meist aggressiv. (2) Zu den Hefepilzen zählen Candida albicans und weitere Candida Arten, sie kommen in gemäßigten Zonen vor. (7)

1.1.2.5 Klinisches Erscheinungsbild

Die Klinik ist schwer von einer bakteriellen Keratitis zu unterscheiden. (2) Der Verlauf der Entzündung ist bei der mykotischen Keratitis deutlich länger. Klassische Beschwerden sind verminderte Sehschärfe, verschwommenes Sehen, Rötung, Tränenfluss, Fremdkörpergefühl, Schmerzen, Photophobie und Sekretion. (14) Häufig treten Satelliteninfiltrate auf, bei denen um ein größeres mehrere kleinere Infiltrate angeordnet sind. (1) Hefepilze weisen typisch ein dichtes, gelb-weißes, eitriges Infiltrat auf, Fadenpilze ein graues oder gelb-weißes Infiltrat mit unscharfen Rändern. Auch wenn es gewisse Charakteristika gibt, sollte eine zuverlässige Diagnose nicht allein aufgrund der Klinik gestellt werden. (15)

1.1.2.6 Diagnostik

Die diagnostische Vorgehensweise ist ähnlich wie die bei der bakteriellen Keratitis. Ein Hornhautabstrich wird mikroskopisch ausgewertet, parallel dazu wird eine Kultur angelegt. Bei den Färbungen ist das Kaliumhydroxid Präparat sensitiver als die Gram- und Giemsa-Färbung. (16) Die Probe wird durch Abkratzen gewonnen und sollte vor Therapiebeginn entnommen werden. Für die Kultur werden die Proben auf Sabouraud-Dextrose-Agar und Blutagar verimpft. Die Spezifität ist hoch, die Sensitivität gering, daher sollte auf ausreichende Probenahme geachtet werden. (17) Zusätzlich werden Kontaktlinsen und deren Kontaktlinsenaufbewahrungsbehälter ebenfalls mikrobiologisch untersucht.

Weiters ist die Diagnostik mittels PCR eine sehr gute Möglichkeit, eine rasche Erregeranalyse zu gewährleisten. Da sie weit sensitiver als die Kultur ist, (18) ist sie meist Goldstandard zur Analyse von mykotischen Keratitiden. (19)

Wird nach 72 Stunden keine Besserung der Beschwerden erzielt, sollte eine Hornhautbiopsie durchgeführt werden. Fadenpilze sind in der Regel anterior der Descement-Membran lokalisiert, daher sollte die Biopsie Entnahme aus dem tiefen Stroma erfolgen.

Zusätzlich stehen die konfokale Mikroskopie und ein Kammerwasseraspirat zur Diagnostik zur Verfügung. (2)

1.1.2.7 Therapie

Auch therapeutisch geht man ähnlich wie bei der bakteriellen Keratitis vor. Epithelgewebe, Mukus und nekrotisches Gewebe sollten entfernt werden, um das Eindringen von Antimykotika zu erleichtern.

Klassisch werden Amphotericin B 0,15% oder Econazol 1% bei hefeartigen Pilzen eingesetzt, bei fadenartigen Pilzen wird Natamycin 5% oder Econazol 1% angewendet. Die Palette an einsetzbaren Antimykotika ist aber weit größer.

Ein zusätzliches Breitbandantibiotikum kann zur Therapie von bakteriellen Begleitinfektionen eingesetzt werden. (2)

Chirurgische Interventionen können bei Perforation, Descementozele-Bildung oder nicht wirksamer medikamentöser Therapie indiziert sein. Debridement oder Keratektomie wird bei kleinen oberflächlichen Läsionen angewandt, penetrierende Keratoplastik bei schwerer Keratitis. (20)

1.1.3 Viruskeratitis

Die häufigsten Erreger der Viruskeratitis sind Herpes-simplex-Viren, Varizella-Zoster-Viren und Adenoviren. Seltener sind Zytomegalie-, Masern-, oder Rötelviren.

1.1.3.1 Herpes-simplex-Keratitis

Die Prävalenz von Herpes-simplex-Virus in der Bevölkerung ist sehr hoch. Während HSV2 vor allem im Genitalbereich zu finden ist und nur selten auf das Auge übertragen wird, ist HSV1 häufiger für Krankheitsbilder am Auge verantwortlich. (2) Die Primärinfektion verläuft oft asymptomatisch, das Virus verbleibt jedoch im Ganglion des betreffenden Dermatoms in einem latenten Stadium, produziert keine infektiösen Viruspartikel, kann aber jederzeit Reaktivierungszyklen durchlaufen. (21)

1.1.3.1.1 Epidemiologie

Okuläre HSV1- Infektionen treten meist im jugendlichen Alter oder bei jungen Erwachsenen auf. Die jährliche Inzidenzrate variiert geographisch, in den USA liegt sie bei 11,8 pro 100.000. (22)

1.1.3.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Die Herpeskeratitis wird in drei Formen klassifiziert, bei denen sich die Klinik gering unterscheidet.

Bei der Keratitis dendritica ist das Hornhautepithel betroffen, sie weist astförmige Läsionen auf, durch die sie auch ihren Namen erhalten hat. An den Spitzen der Astfiguren befinden sich sogenannte Knospen, nekrotische Endothelzellen. Mittels Fluoreszeins können die Astfiguren in der Spaltlampe gut dargestellt werden. Die Infektion tritt einseitig auf, die Patient*innen klagen über Schmerzen und Fremdkörpergefühl, das Auge ist gerötet. Die Keratitis herpetica interstitialis betrifft das Hornhautstroma. Sie tritt selten isoliert auf und ist durch helles Stromainfiltrat gekennzeichnet.

Bei der Keratitis disciformis ist das Hornhautendothel betroffen. Es zeigt sich eine scheibenförmige Hornhauttrübung, da infizierte Endothelzellen anschwellen und die Entwässerung der Hornhaut nicht mehr vollziehen können. Eine Regeneration des Hornhautendothels ist nicht möglich. (1)

1.1.3.1.3 Diagnostik

Die Diagnose wird aufgrund der Symptomatik vor allem klinisch gestellt. Ein Oberflächenabstrich oder Aspirat von Kammerwasser aus der vorderen Augenkammer wird mittels PCR ausgewertet. In der Spaltlampe sind nach Färbung die dendritischen Ausläufer erkennbar. (23) Eine Antikörpertiter-Bestimmung ist aufgrund der hohen Durchseuchungsrate wenig zielführend.

1.1.3.1.4 Therapie

Die medikamentöse Therapie besteht aus der Verabreichung von hochwirksamen Virostatika. Bei der Keratitis dendritica ist das entweder eine Aciclovir oder Ganciclovir Augensalbe. Auch Trifluorthymidin-Augentropfen können verwendet werden. Um den Heilungsverlauf effizienter zu gestalten, kann das infizierte Epithel entfernt werden. (1) Mit dieser Therapie heilen 99% Prozent der Fälle innerhalb von zwei Wochen. (2) Glukokortikoid haltige Augentropfen sind bei der epithelialen Keratitis kontraindiziert, da sie die Ausbreitung der Viren fördern und die Regeneration des Epithels verlangsamen. Bei der Keratitis herpetica interstitialis und der Keratitis disciformis ist ebenfalls Aciclovir oder Ganciclovir Augensalbe indiziert, in schweren Fällen muss Aciclovir systemisch verabreicht werden. (2)

1.1.3.2 Herpes Zoster Keratitis

Das Varicella-Zoster-Virus gehört zur Unterfamilie der Herpesviren und verursacht Windpocken und Herpes Zoster, im Volksmund auch als Gürtelrose bekannt. Am Auge spricht man von Herpes Zoster, wenn der erste Ast des Nervus trigeminus, nämlich der Nervus ophthalmicus, betroffen ist und es zu einem Rezidiv der Windpockenerkrankung kommt. (1) Es handelt sich dann um einen Zoster ophthalmicus, der eine Keratitis als schwere Begleiterkrankung haben kann. (2)

1.1.3.2.1 Epidemiologie

Die Durchseuchung mit Varizellen ist weltweit sehr hoch und steigt kontinuierlich. Damit steigt auch die Häufigkeit der Augenbeteiligung. (24) Die betroffenen Patient*innen haben oft Immunschwächen durch Grunderkrankungen oder immunsuppressive Medikation.

1.1.3.2.2 Klinisches Erscheinungsbild

Die Symptome sind meist auf die Haut beschränkt, eine Beteiligung des Auges kann daher oft übersehen werden. Vor dem Exanthem haben die Betroffenen ein Prodromalstadium mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Müdigkeit, Abgeschlagenheit. Danach entsteht ein erythematöser Bereich mit Bläschen. (2)

Am Auge findet man, wenn die Keratitis auf die Oberfläche beschränkt ist, punktförmige bis fleckenförmige Epithelläsionen. Ist die Keratitis in die Tiefe gehend, treten Endothelitis, Trabekulitis und Iridozyklitis auf. Der Zoster ophthalmicus ist fast immer eine einseitige Erkrankung. (1) Entzündungsbläschen auf der Haut der Nase werden als Hutchinson-Zeichen beschrieben und sind charakteristisch für eine Beteiligung des Augeninneren.

1.1.3.2.3 Diagnostik

Diagnostisch achtet man auf das Hutchinson-Zeichen und neben einer gründlichen Anamnese und einem augenärztlichen Status kann man Bläscheninhalt mittels PCR, Immunmikroskopie oder Kultur bestimmen.

1.1.3.2.4 Therapie

Die Therapie erfolgt aufgrund des Hautbefalls systemisch und lokal. Statt Aciclovir setzt man heute eher Valaciclovir und Famciclovir ein, da sie bei gleicher Wirksamkeit besser verträglich sind und das Dosierungsschema einfacher ist. (25)

Im Idealfall sollte die Therapie während der ersten 72 Stunden beginnen und 7 bis 10 Tage dauern. Lokal wird Aciclovir oder Ganciclovir Augensalbe geschmiert.

In Kombination können Kortikosteroide oral verabreicht werden, da diese nachweislich die Dauer der Schmerzen während der akuten Phase der Erkrankung verkürzen. (26)

1.1.3.3 Epidemische Keratokonjunktivitis

Adenoviren hauptsächlich vom Typ 8, 19, 37 und weitere können eine Bindehaut-, sowie gleichzeitig eine Hornhautentzündung auslösen. Die Infektion ist hoch ansteckend und beginnt fast immer auf einem Auge, weitet sich aber nach ungefähr einer Woche auf das zweite Auge aus. Klassisch sind münzförmige Hornhauttrübungen, sogenannte Nummuli, die über Monate persistieren und den Visus vermindern können. (1)

1.1.3.3.1 Epidemiologie

Die Erkrankung ist hochinfektiös und wird durch direkten Kontakt, fäkal-oral und durch kontaminiertes Wasser übertragen. Sie kann unter Umständen auch bei Augenuntersuchungen übertragen werden. Patient*innen jeden Alters können betroffen sein, Immunsuppression zählt als Risikofaktor. (27)

1.1.3.3.2 Klinisches Erscheinungsbild

Die Betroffenen klagen über Tränenträufeln, Fremdkörpergefühl und Photophobie. Zusätzlich können auch grippeähnliche Symptome auftreten. Das Auge kann gerötet sein und in der Spaltlampe können Nummuli beobachtet werden. (27)

1.1.3.3.3 Diagnostik

Die Diagnose basiert hauptsächlich auf der klinischen Untersuchung. Außerdem gibt es noch diverse Labortests wie beispielsweise die PCR oder den Antigennachweis, wodurch Adenoviren nachgewiesen werden können. (27)

1.1.3.3.4 Therapie

Die Therapie erfolgt symptomorientiert, eine standardisierte spezifische Therapie hat sich noch nicht durchgesetzt. Da die epidemische Keratokonjunktivitis sehr infektiös ist, gilt es strenge Hygienemaßnahmen zu ergreifen. (28)

1.1.4 Protozoenkeratitis

Protozoen sind einzellige, eukaryotische Organismen, die zahlreiche Erkrankungen hervorrufen können.

1.1.4.1 Akanthamöben-Keratitis

Akanthamöben sind ubiquitär vorkommende Protozoen, die über mikroskopische Epithelläsionen ins Auge eindringen können. In der Natur findet man sie häufig im Boden und im Trinkwasser vor, daher auch in verschmutzten Kontaktlinsenbehältnissen. (1)

1.1.4.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz ist von Region zu Region unterschiedlich, dies hängt von der Kontamination von Haus- und Schwimmbadwasser, der amöbiziden Wirksamkeit von Kontaktlinsen-Reinigungssystemen und der Verwendung von wiederverwendbaren weichen Kontaktlinsen ab. Sie kommt bei 1- 33 Fällen pro einer Million Kontaktlinsenträger*innen vor. (29)

1.1.4.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Die Symptomatik tritt einseitig auf und ist meist sehr schmerzhaft. Die ersten Symptome sind häufig Photophobie, starke Schmerzen, die nicht in Relation zur Klinik sind, Epiphorie und verminderte Sehschärfe.

Im Frühstadium finden sich eine graue, unregelmäßige Epitheloberfläche, Pseudodendriten, epitheliale oder subepitheliale und perineurale Infiltrate. (30) Die

Infiltrate nehmen an Größe zu und verschmelzen zu einem Ringabszess, der charakteristisch für die Akanthamöben-Keratitis ist. (2) Wenn die Krankheit fortschreitet, kann sich eine Skleritis, Ulzerationen, und eine sekundäre sterile vordere Uveitis mit Hypopyon entwickeln. Eine Stromatrübung und –vaskularisierung können zu einer Hornhauteinschmelzung führen. (30)

1.1.4.1.3 Diagnostik

Für den Arzt bzw. die Ärztin ist das frühe Stadium der Akanthamöben-Keratitis leicht mit einer Herpes simplex Infektion und das Spätstadium mit einer mykotischen Keratitis zu verwechseln. Zur korrekten Diagnosestellung wird eine Kultur angelegt, indem E-coli-Agarplatten verimpft werden. Ein Abstrich wird mikroskopisch mittels Gram- oder Giemsa-Färbung betrachtet, um etwaige Zysten zu beschreiben. Zusätzlich kann eine Immunhistochemie, konfokale Mikroskopie, oder PCR durchgeführt werden. (30)

1.1.4.1.4 Therapie

Vor dem Einsatz einer medikamentösen Therapie sollte ein Débridement durchgeführt werden, um das infizierte Epithel zu entfernen und damit anschließend eine bessere Resorption der zu verabreichenden Augentropfen zu ermöglichen.

Lokal verwendet man Mittel gegen Akanthamöben wie Biguanide und Diamidine, sowie Glukokortikoide und bei Schmerzen nichtsteroidale Antiphlogistika.

Biguanide, vor allem Polyhexamethylenbiguanid und Chlorhexidin, stören die zytoplasmatische Membran und schädigen Zellbestandteile und Atemwegsenzyme. Sie töten damit Trophozoiten und wirken zystizid.

Diamidine wie Propamidinisethionat und Hexamidin wirken auf die Durchlässigkeit der Zellmembran, sie wirken ebenfalls gegen Trophozoit und Zyste. (31)

Eine ideale Therapiefolge wurde noch nicht bestimmt, meist wird Polyhexamethylenbiguanid mit Chlorhexidin, oder eines von beiden mit Hexamidin kombiniert. (2)

Der Einsatz von Glukokortikoiden ist umstritten. Man kann bei schwerer Entzündung mindestens zwei Wochen nach dem Beginn der gegen die Amöben gerichteten Therapie auf sie zurückgreifen.

Im Fall einer Perforation oder wenn die Antiamöbentherapie nicht die gewünschte Wirkung erzielt, sollte eine therapeutische Keratoplastik in Betracht gezogen werden (30)

1.2 Endophthalmitis

Die Endophthalmitis ist eine schwere Entzündung des Augenninneren und kann zur Erblindung führen. Sie ist auf eine Infektion zurückzuführen, die sich entweder durch einen entfernten Infektionsherd hämatogen auf das Auge ausgeweitet hat, oder sie kommt durch direkten Kontakt des Erregers mit dem Auge zustande. Je nach Übertragungsweg kann man die Endophthalmitis daher in eine endogene oder in eine exogene klassifizieren. (32)

1.2.1 Endogene Endophthalmitis

Bei der endogenen Endophthalmitis gibt es im Körper einen Infektionsherd, der hämatogen in das Auge gestreut hat.

Sie tritt seltener als die exogene Endophthalmitis auf, die Häufigkeit ist von genetischen, geographischen und ernährungsbedingten Faktoren abhängig. Je nach Literatur und Region variiert der relative Anteil an endogener Endophthalmitis, bezogen auf die absolute Zahl an Endophthalmitisfällen. Bei einer größeren Studie in Indien liegt der Anteil im einstelligen Prozentbereich. (33)

Die Infektion ist auf grampositive Bakterien, gramnegative Bakterien und Pilze zurückzuführen. In Ostasien überwiegen die gramnegativen, in Europa und Nordamerika die grampositiven Bakterien und Pilze. (34)

Als Risikofaktoren für die endogene Endophthalmitis zählen chronische Stoffwechselerkrankungen, Immunsuppression, Malignität, intravenöser Drogenmissbrauch, langfristiges Vorhandensein eines intrakorporalen Fremdkörpers und invasive Chirurgie. (32)

1.2.1.1 Klinisches Erscheinungsbild

Obwohl die Ursache eine hämatogene Streuung ist, ist meist nur ein Auge betroffen. Während am Auge Schmerz, Rötung, Schwellung, verschwommenes Sehen und Sekretion vorliegen, sind die systemischen Symptome selbst bei schweren Verläufen oft gering ausgeprägt und unspezifisch. Daher kann es leicht passieren, dass der eigentliche Infektionsherd übersehen wird und damit beispielsweise eine Endokarditis gar nicht erst diagnostiziert wird. (32) Aus einer Studie in Südtaiwan geht hervor, dass 20% der Patient*innen, die eigentlich primär von einem Leberabszess betroffen waren, als erstes einen Augenarzt oder eine Augenärztin aufgesucht haben. (35)

1.2.1.2 Diagnostik

Die Diagnose wird klinisch gestellt und mittels Kultur oder PCR bestätigt. (36) Des Weiteren sollten systemische Ursachen wie Malignome, Leberabszesse und Endokarditiden abgeklärt werden. (32)

1.2.1.3 Therapie

Die Therapie sollte sofort nach dem Stellen der klinischen Diagnose eingeleitet werden, noch vor der Bestätigung durch das Labor. Je nach Infektion wird mit einem Breitbandantibiotikum in Kombination mit einer intravitrealen Antibiotikainjektion, oder mit einem Antimykotikum, beispielsweise Amphotericin B, begonnen.

Der Einsatz von Glukokortikoiden ist umstritten, lokal werden sie gegebenenfalls zur Hemmung von Entzündung und Linderung von Schmerz eingesetzt. (32)

Operativ ist bei anhaltenden Entzündungen eine pars plana Vitrektomie möglich. Diese dient der Entfernung von Krankheitserregern und ermöglicht die Applikation von Medikamenten. (37)

1.2.1.4 Prognose

Die Prognose ist im Allgemeinen schlecht, insbesondere wenn es sich bei dem Erreger um *Klebsiella pneumonia* handelt. Das Risiko auf Visusverlust ist hier deutlich erhöht. (32)

1.2.1.5 Erregerspektrum

1.2.1.5.1 Endogene bakterielle Endophthalmitis

Der Verlauf ist meist akut und gekennzeichnet durch vermindertes Sehvermögen, Augenschmerz, Hypopyon und Vitritis. Systemische Symptome sind grippeähnlich und mit Fieber, falls sie überhaupt vorhanden sind. (38) Das Erregerspektrum beläuft sich auf *Staphylokokkus aureus*, Streptokokken, einschließlich Viridans streptococci, *Streptococcus pneumoniae* und gramnegative Bazillen wie *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*. (36) Therapeutisch werden Antibiotika eingesetzt, ebenso kann eine Vitrektomie indiziert sein. (38)

1.2.1.5.2 Endogene Pilzendophthalmitis

Der häufigste Erreger bei der Pilzendophthalmitis ist *Candida albicans* und tritt als Folge von Candidämie auf. Sie manifestiert sich als Chorioretinitis, wobei die Symptome häufig erst bei einer Vitritis auftreten. Risikofaktoren sind unter anderem ein zentralvenöser Katheter, totale parenterale Ernährung, Breitbandantibiotika, kürzlich durchgeführte Bauchoperationen, Neutropenie und Glukokortikoidtherapie. Bei vielen Patient*innen ist die Infektion aber auf das Injizieren von Drogen zurückzuführen. (34)

Bei der Augenuntersuchung finden sich typischerweise flauschige, weiße chorioretinale Läsionen vor, bestätigt wird die Diagnose mittels Glaskörperkultur.

Die Behandlung erfolgt mit einer systemischen Therapie, sowie gegebenenfalls intravitrealen Antimykotika, oder bei Glaskörperbefall mittels Vitrektomie.

Aspergillus fumigatus ist selten und tritt bei Immunsuppression auf. (36)

1.2.2 Exogene Endophthalmitis

Bei der exogenen Endophthalmitis gelangen die Erreger durch direkten Kontakt mit der Augenoberfläche in das Auge. Man unterscheidet je nach Ätiologie eine posttraumatische oder eine postoperative exogene Endophthalmitis. (39) Die akute postoperative Endophthalmitis tritt meistens zwei bis vier Tage nach der Operation auf. Sie kann aber auch deutlich später auftreten und wird dann als subakute bzw. sechs Wochen postoperativ als chronische Endophthalmitis bezeichnet.

Die Bakterien, die ins Auge verschleppt werden, befinden sich meistens am Lidrand, oder in der Bindehaut.

Die Inzidenz variiert nach Literatur und geographischem Standort, sowie Hygienestandard der Kliniken. Nach einer Katarakt-OP beträgt sie zwischen 0,03% und 0,2%, (40) nach intravitrealen Injektionen 0,016%. (41) Die Inzidenz der posttraumatischen Endophthalmitis wird zwischen 0,9% und 17% angegeben. (42)

1.2.2.1 Klinisches Erscheinungsbild

Die häufigsten Symptome sind Visusverlust und Schmerzen, Hornhautödem, Hypopyon und Glaskörperinflammation. (43) Weitere Hinweise sind Augenlidschwellung, Rötung, Photophobie, Sekretion, fibrinöse Membranen in der Vorderkammer und Floater. Bei chronischer Endophthalmitis weisen Patient*innen geringe Entzündungszeichen in der Vorderkammer sowie Vitritis auf. (39)

1.2.2.2 Diagnostik

Diese erfolgt klinisch mittels Spaltlampenuntersuchung, Sonografie und OCT und wird mittels Kultur und PCR bestätigt.(39)

1.2.2.3 Therapie

Behandelt wird lokal mit Kortison und zwei Antibiotika, meist Vancomycin und Ceftazidim, gegen grampositive und gramnegative Bakterien und nach Antibiotika-Resistenztestung gezielt gegen den Erreger.

Intravitreale Injektionen ermöglichen hohe Konzentrationen des Arzneimittels, ohne damit verbundene systemische Nebenwirkungen zu riskieren.

Chirurgisch kann eine Vitrektomie indiziert sein. (39)

1.2.2.4 Prognose

Die Prognose der exogenen Endophthalmitis unterscheidet sich je nach Ätiologie. Das ist auf das unterschiedliche Erregerspektrum zurückzuführen. Insgesamt ist die Prognose jedoch schlecht und die Unterschiede halten sich in Grenzen. Die verzögert einsetzende postoperative Endophthalmitis hat eine bessere Prognose als die akut einsetzende. (44)

Auch die Bleb-assoziierte Endophthalmitis nach Trabekulektomie hat aufgrund der hohen Prävalenz virulenter Krankheitserreger wie Arten von Streptokokken und gramnegativer Bakterien eine schlechte Prognose. Ebenso finden sich bei Endophthalmitis nach intravitrealen Injektionen häufig virulente Arten von Streptokokken. Eine Studie berichtet, dass sich der Visus bei 80% der Patient*innen auf Handbewegungen beschränkt oder noch schlechter ausfällt. (45) Für die posttraumatische Endophthalmitis beschreibt eine Studie 45% der Teilnehm*innen, die nur noch Handbewegungen und 23%, die nur noch Lichtreaktionen wahrnehmen können. (46)

1.2.2.5 Erregerspektrum

1.2.2.5.1 Akute postoperative Endophthalmitis

Sie ist durch das Auftreten innerhalb sechs Wochen postoperativ, meist nach einer Kataraktoperation, definiert. In der Regel tritt sie bereits zwei bis vier Tage postoperativ auf. Zu den Risikofaktoren zählen Blepharitis, Diabetes mellitus, höheres Alter, sowie intraoperative Komplikationen, beispielsweise eine hintere Kapselruptur. Die häufigsten

Erreger sind Koagulase-negative Streptokokken (70%), gefolgt von Staphylococcus aureus (10%) und Arten von Streptokokken (9%). (34) Verminderte Sehschärfe, Augenschmerzen, gerötete Augen sind klassische Symptome. Ein Augenlidödem kann vorkommen, Hypopyon findet sich häufig. (47)

Therapeutisch werden Vancomycin und Ceftazidim intravitreal injiziert.

1.2.2.5.2 Chronische postoperative Endophthalmitis

Definitionsgemäß tritt die chronisch postoperative Endophthalmitis nach frühestens sechs Wochen postoperativ auf, in einigen Fällen erst nach einem Jahr. (44) Sie ist seltener als die akute Form und verläuft symptomatisch milder. Das kann eine leichte Entzündung sein und Augenschmerzen, selten ein Hypopyon miteinschließen. Der Erreger ist meistens Propionibacterium acnes, das mit intravitrealen Vancomycin behandelt wird. (34)

1.2.2.5.3 Bleb-assoziierte Endophthalmitis

Bleb assoziierte Endophthalmitis tritt auf, wenn sich infektiöses Material bei einer bestehenden Blebitis über die Vorderkammer im Auge ausweitet. Sie kommt nach einer Trabekulektomie innerhalb von 4 Wochen postoperativ akut oder verzögert vor. Im Unterschied zur Blebitis besteht zumindest eine Glaskörperbeteiligung. Symptomatisch stehen Schmerzen, verminderte Sehschärfe, relativ afferenter Pupillendefekt und Hypopyon im Vordergrund. Bei der akuten Variante sind Koagulase-negative Staphylokokken und Staphylokokkus aureus die häufigsten Erreger, bei der verzögerten sind es Arten von Streptokokken und Moraxella catarrhalis. Die Therapie besteht in der Verabreichung von intravitrealem Vancomycin und Ceftazidim und lokaler Antibiose. (40)

1.2.2.5.4 Post-intravitreale Injektion Endophthalmitis

Intravitreale Injektionen von Anti-VEGF werden zur Behandlung der neovaskulären Makuladegeneration verabreicht. Die Inzidenz ist gering, eine Metaanalyse beschreibt sie mit 0,02-0,32%. (48) Die Symptome treten gewöhnlich akut innerhalb weniger Tage auf und beinhalten vermindertes Sehvermögen, Augenschmerzen und Rötung mit Vorhandensein von Vorderkammerzellen, Hypopyon und Vitritis. Koagulase-negative

Staphylokokken und Streptokokken sind die häufigsten Erreger. Die Behandlung ist gleich der akuten postoperativen Endophthalmitis. (34) Es wird außerdem eine nichtinfektiöse Endophthalmitis beschrieben, die auf eine entzündliche Reaktion auf das Medikamentenvehikel zurückzuführen sein könnte. (49)

1.2.2.5.5 Posttraumatische Endophthalmitis

Diese tritt selten auf, Risikofaktoren sind vor allem Metall- und Holzsplitter oder allgemein intraokuläre Fremdkörper, Beteiligungen der Linse und verzögerte Behandlung. (50) Die Symptome treten meist innerhalb von Stunden auf und können Hypopyon, vermindertes Sehvermögen, Schmerzen in keinem Verhältnis zum Grad des Traumas, Retinitis, Vitritis, Netzhautnekrose und Periphlebitis umfassen. Ein wichtiger Erreger ist *Bacillus cereus*, der für einen fulminanten Verlauf sorgt. Weiters sind es Koagulase-negative Staphylokokken und Streptokokken, die zu dem Erregerspektrum zählen. Die Behandlung sollte aggressiv sein, mit Vitrektomie, intravitrealen Vancomycin plus Ceftazidim, sowie Kortison und systemischer Therapie. (34)

1.2.2.5.6 Candida Endophthalmitis

Auch wenn die Mehrheit der *Candida* Endophthalmitis Fälle endogen bedingt sind, gibt es selten exogene Fälle durch Operationen. Die Infektion tritt meistens zuerst in der Vorderkammer auf und weitet sich dann auf den Glaskörper aus. Einer der häufigsten Erreger ist *Candida parapsilosis*, die Kontamination mit ihm ist durch sein Auftreten in Spülflüssigkeit assoziiert. (51) Die Therapie umfasst die intraokulare Injektion von Amphotericin oder Voriconazol, Vitrektomie und systemischem Voriconazol oder Fluconazol. (34)

1.2.2.5.7 Schimmelpilz Endophthalmitis

Die Schimmelpilz Endophthalmitis ist ebenfalls selten, doch wenn sie auftritt, dann meistens exogen durch ein Trauma, eine Operation, oder als Folge einer Keratomykose bei der der Schimmelpilz durch die Hornhaut in die Vorderkammer eindringt. Die Haupterreger sind *Aspergillus* und *Fusarium*. Klinisch präsentiert sie sich oft subakut

einige Wochen nach der Operation. (52) Die Spaltlampenuntersuchung des Auges zeigt oft ein Hypopyon und Klumpen aus dickem weißem Material in der Vorderkammer. Die Diagnosestellung erfolgt mittels Kultur von Kammerwasser und Glaskörper. Die Therapie beinhaltet das operative Entfernen von Material im Kammerwasser, die Vitrektomie bei signifikanter Vitritis und die intravitreale Injektion von Antimykotika wie Amphotericin oder Voriconazol, sowie systemische Voriconazoltherapie. (34)

1.3 Kultivierung von Mikroorganismen

Die Kultur zur Anzucht von Mikroorganismen ist in der heutigen Medizin nicht wegzudenken. Obwohl es modernere Verfahren wie die 16s rRNA-Sequenzierung gibt, ist die Kultur nach wie vor eine erprobte, kostengünstige Methode zur Bestimmung von Krankheitserregern und deren Resistenzen. Der Prozess reicht von der Probengewinnung, beispielsweise durch einen Abstrich, über das Anlegen der Kultur auf ein passendes Nährmedium, dem Auftrennen und Bestimmen der Bakterien, bis zum Erstellen eines AntibioGRAMMs. Die Anlage einer Kultur lässt sich auch nicht durch die direkte mikroskopische Untersuchung ersetzen, denn diese ist erst ab einer Erregerzahl von 10^5 Zellen pro Milliliter Untersuchungsmaterial möglich. Um ein falsch negatives Ergebnis zu vermeiden, wird praktisch immer parallel eine Kultur gezüchtet. (53)

1.3.1 Probengewinnung

Die Klinik der Patient*innen spielt bei der Wahl des richtigen Nährbodens eine wichtige Rolle, da diese auf den mutmaßlichen Erreger rückschließen lässt und nicht jeder Erreger auf jedem Medium wächst. Es gilt auf den richtigen Entnahmeort, Zeitpunkt und die korrekte Abnahmetechnik zu achten. Konkret sollte die Entnahme vor Beginn einer Antibiotika Therapie erfolgen, da die Bakterien sonst häufig absterben und folglich ein falsch negatives Ergebnis erzielt wird. Das richtige Timing ist infektionsspezifisch, so sollte beispielsweise bei einer Sepsis die Blutkultur zu Beginn des Fieberanstiegs angelegt werden. Der Entnahmeort weist idealerweise eine hohe Erregerlast auf und kann oberflächlich mittels Abstriches oder invasiv erreicht werden. Zur Verfügung stehen unter

anderem Ösen, Tupfer und Wattestäbchen. In invasiven Fällen ist eine Punktion erforderlich.

Die physiologische Bakterienflora muss bei der Auswertung berücksichtigt werden. Um die Kontamination durch Körperregionen mit Standort-Flora weitestgehend zu vermeiden, muss die Haut vor der Entnahme adäquat desinfiziert werden.

Der anschließende Transport kann mit speziellen Transportmedien durchgeführt werden, die in der Lage sind, eine Bakterienkultur für 24 bis 72 Stunden zu stabilisieren. (53)

1.3.2 Von der Bebrütung zur Auswertung

Nachdem die geeigneten Nährböden beimpft sind, erfolgt die Bebrütung bei meist 37°C. Die erste Kultur aus dem Untersuchungsmaterial wird auch Primärkultur genannt. Diese ist abhängig vom Ort der Materialgewinnung und ist in der Regel eine Mischkultur mit mehreren Erregerspezies. Das Ziel ist die Gewinnung einer Reinkultur. Aus der Primärkultur werden Subkulturen gezüchtet, bis eine Reinkultur entstanden ist, aus der dann der Erreger bestimmt wird. Bereits die Morphologie der Bakterienkultur kann erste Hinweise auf die Art liefern. Streptokokken bilden beispielsweise kleine Kolonien aus, Sporenbildner wirken pelzig oder wurzelförmig. Aerobier wie *Pseudomonas aeruginosa* wachsen in flüssigen Medien an der sauerstoffreichen Oberfläche. Grundsätzlich wird der Rand, die Form, Erhebungen oder Hämolyse bei Kulturen in festen Medien beschrieben. Bei den flüssigen Medien unterscheidet man zwischen Bodensatz- und Pfropfbildungen, sowie Trübungen.

Ebenso ist der Zeitraum bis zum sichtbaren Ausbilden der Kultur richtungsweisend und relevant für das anschließende Antibiogramm. Enterobakterien, wie *E. coli*, haben eine rasche Vermehrungszeit und können bereits nach 24 Stunden abgelesen werden. Bei Sprosspilzen ist die Ablesung nach wenigen Tagen möglich, bei Mykobakterien sind es oft mehrere Wochen. Endgültige Ergebnisse bringen mikrobiologische Identifizierungsverfahren wie die biochemische Leistungsprüfung, oder der Nachweis erregerspezifischer Antikörper im Zusammenhang mit der Klinik der Patient*innen. Bei der biochemischen Leistungsüberprüfung konzentriert man sich auf die Substratumsetzung der Bakterienkultur. Je nach Spezies kann bei der Substratumsetzung ein charakteristischer Farbumschlag mittels zugesetzter Indikatoren beobachtet werden. Am Ende muss das Ergebnis noch richtig interpretiert werden, es muss beurteilt werden, ob der gefundene

Keim auch die tatsächliche Ursache für die Erkrankung ist. Stammt der Erreger aus einer isolierten Körperregion wie dem Blut, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass der gefundene Keim auch der Ursächliche ist. Bei Regionen mit Standort-Flora, wie beispielsweise der Konjunktiva, wird zwischen obligat und fakultativ pathogenen Keimen unterschieden. Bei Weiterem wird die Grenzzahl mit einbezogen, sprich die Höhe der Erregerzahl im Vergleich zum Normalzustand. (53)

1.3.3 Nährböden

Zur Kultivierung von Mikroorganismen werden, je nach deren Anspruch, geeignete Nährmedien benötigt. Man kann diese in feste und flüssige Nährböden einteilen, wobei die festen meist mit Agar verfestigt wurden.

Zusätzlich unterscheidet man zwischen synthetischen und komplexen Nährböden. Erstere enthalten chemisch exakt definierte Bestandteile in bekannter Konzentration, in zweiteren ist die genaue chemische Zusammensetzung unbekannt, sie bestehen aus nicht weiter definierten Naturprodukten wie Hefe- oder Fleischextrakt. Auf Komplexnährböden können viele verschiedene Mikroorganismen gleichzeitig wachsen, synthetische Nährböden werden für stoffwechselphysiologische Untersuchungen verwendet.

Je nach Verwendungszweck kann auch zwischen Universal- und Selektivnährböden differenziert werden. Auf Selektivnährböden wird gezielt eine Spezies gezüchtet, das Wachstum anderer Organismen wird gehemmt. Universalnährböden, zu denen die komplexen Nährböden zählen, bieten Nährstoffe für viele verschiedene Mikroorganismen. Zur Identifikation von Organismen gibt es Differentialnährböden, die mit bestimmten Stoffwechselprodukten reagieren und eine Verfärbung verursachen. (54)

1.4 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA- oder RNA-Regionen, so dass diese ausreichend nachgewiesen werden kann. In der Medizin spielt sie eine wichtige Rolle in der Diagnostik von Erbkrankheiten, zum Erregernachweis und in der Forschung. Zusätzlich wird sie beispielsweise auch bei Vaterschaftstests und in der Forensik angewendet.

Für die PCR werden vier Hauptkomponenten benötigt. Diese sind die originale DNA mit dem zu vervielfältigenden Abschnitt, zwei Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate, die als Baustoffe zur Synthese des neuen DNA-Strangs dienen. Primer sind spezielle Oligonukleotide, die komplementär zu einem gewissen Abschnitt auf den beiden Einzelsträngen der Ausgangs-DNA sind und den Startpunkt der Synthese markieren. (55)

Während früher die Polymerase bei jedem Denaturierungsschritt zerstört wurde, bedient man sich heute einer thermostabilen DNA-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird und bei Temperaturen von 94°C nicht denaturiert. Kary Mullis gilt als der Entwickler der PCR. (56)

1.4.1 Ablauf der PCR

Es gibt drei Hauptschritte im Verlauf einer PCR, nämlich die Denaturierung, die Primerhybridisierung und die Elongation. Im ersten Schritt wird die Ausgangs-DNA auf 94°C erhitzt und dadurch in zwei Einzelstränge geteilt. Anschließend wird die Temperatur auf 45°C-60°C gesenkt, wodurch sich die Primer an die komplementären Stellen auf der zu vervielfältigenden DNA anlagern können. Nun können sich im letzten Schritt bei 72°C mit Hilfe der DNA-Polymerase die passenden Desoxyribonukleosidtriphosphate anlagern und ein identischer DNA-Abschnitt entsteht. Da beide Einzelstränge der aufgespaltenen DNA während des PCR-Prozesses kopiert werden, wächst die Anzahl der Genkopien exponentiell. (55)

Die Aufreinigung von PCR-Produkten kann mittels Agarose-Gelelektrophorese geschehen, wodurch diese anhand deren Größe bestimmt werden können. (57)

1.4.2 Varianten der PCR

Seit der Entdeckung der PCR wurden verschiedene Varianten entwickelt, die je nach Fragestellung angewendet werden können. Die häufigsten werden im Folgenden erläutert. Bei der Digital PCR (dPCR) handelt sich um eine Methode, bei der eine Mengenbestimmung durchgeführt werden kann. Dazu wird eine DNA-Probe verdünnt und in Reagenzgläsern in bis zu einer Million Teilproben aufgeteilt. Enthält eine Teilprobe DNA, dann gibt es ein Digitalsignal, wodurch die absolute Quantifizierung der

DNA/RNA-Kopienzahl möglich ist. (56) Die quantitative Echtzeit PCR (qPCR) dient ebenfalls zur Bestimmung der Menge des vervielfältigten DNA-Abschnitts. Dies erfolgt durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffs, der proportional zur Menge der in der Probe vorhandenen DNA ist. Bei jedem Zyklus, „in Echtzeit“, kann mittels Messung des Fluoreszenzfarbstoffs auf die Menge der DNA rückgeschlossen werden, wohingegen bei der normalen PCR lediglich die eine Endpunktmessung erfolgt. Die PCR ähnelt einer Sättigungskurve mit exponentiellem Anstieg der Produkte zu Beginn bis zu einem Erreichen einer Plateauphase, aufgrund des Verbrauchs der zugeführten Substrate wie Primer und Nukleoside. Das Erreichen eines definierten Schwellenwerts in der Sättigungskurve ist abhängig von der ursprünglichen Anzahl an Kopien und lässt so auf die Ausgangsmenge schließen. (58)

Mit der Reverse-Transkriptase-PCR (rtPCR) kann RNA amplifiziert werden, die zuvor mittels reverser Transkriptase in DNA umgeschrieben wurde. Die Ausgangs-RNA kann anschließend quantifiziert werden. Sie wird beispielsweise zum Nachweis von viraler RNA eingesetzt. (59)

Die Nested-PCR (nPCR) (dt. „verschachtelt“) ist nützlich, wenn nur sehr geringe Mengen der zu amplifizierenden DNA relativ zur Gesamtprobenmenge an DNA vorhanden sind. Es werden in der Regel zwei aufeinander folgende Amplifikationsreaktionen durchgeführt, bei denen jeweils ein anderes Primerpaar verwendet wird. Das Produkt der ersten Amplifikationsreaktion wird als Matrize für die zweite PCR verwendet, wodurch die Nested-PCR eine sehr hohe Spezifität aufweist. Durch die Verwendung von zwei Primerpaaren kann eine höhere Anzahl von Zyklen durchgeführt werden, was eine hohe Sensitivität zur Folge hat. (60)

1.5 Next Generation Sequencing

Next Generation Sequencing zählt zu den DNA-Sequenzierungsmethoden mit höherer Durchsatzrate und damit höherer Geschwindigkeit als ihre Vorgänger Modelle. Heutzutage kann mittels NGS das gesamte menschliche Genom innerhalb eines Tages sequenziert werden. Im Gegensatz dazu benötigt die davor verwendete Sanger-Sequenzierung dafür ein Jahrzehnt. NGS hat verschiedene Anwendungsgebiete, unter anderem wird es in der Genetik zum Nachweis von Mutationen und in der Onkologie eingesetzt. Außerdem wird es in der Mikrobiologie zur Charakterisierung von Krankheitserregern verwendet, wodurch

genauere Resultate erzielt werden können als mit konventionellen Methoden wie Charakterisierung durch Morphologie, Farbeigenschaften und metabolische Kriterien. (61) Voraussetzung für die Sequenzierung ist eine DNA-Bibliothek. Die Nukleinsäuren müssen isoliert, fragmentiert und mit der verwendeten Sequenzierungsplattform kompatibel gemacht werden. Nach der Sequenzierung folgt die Datenanalyse, die angesichts der enormen Datenanzahl mit speziellen Programmen erfolgt. (62)

1.5.1 Sequenzierung der ersten Generation

Die Sanger-Sequenzierung gilt als Sequenzierungsmethode der ersten Generation. Sie wird auch Kettenabbruch-Synthese genannt und basiert auf der Zugabe von Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP). Durch den Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) in den Strang, der gerade neu synthetisiert wird, stoppt die DNA-Polymerase und als Folge entsteht ein DNA-Fragment. Mittels Gelelektrophorese werden die DNA-Fragmente anschließend der Länge nach aufgetrennt. Durch die Sortierung nach der Länge sowie Markierung der unterschiedlichen Didesoxynukleosidtriphosphate mit Fluoreszenz lässt sich auf die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges schließen. (62)

1.5.2 Sequenzierung der zweiten Generation

Die Sequenzierungsmethoden, die nach der Sanger-Sequenzierung entwickelt wurden, werden als Next Generation Sequencing beschrieben. Hier kann man wiederum Sequenzierungsmethoden der zweiten bzw. dritten Generation unterscheiden. Zur zweiten Generation zählt die Sequenzierung durch Hybridisierung und die Sequenzierung durch Synthese.

Bei der Sequenzierung durch Hybridisierung binden fragmentierte, mit Farbstoffen markierte DNA-Fragmente an Oligonukleotide auf einer Matrix. Durch wiederholtes Hybridisieren und Auswaschen ungebundener Fragmente lässt sich das Hybridisierungsmuster anhand der Farbmarkierungen und deren Stärke ablesen. Die Oligonukleotide auf der Matrix, sowie deren Überlappungsbereiche sind bekannt, wodurch ein Rückschluss aus dem Farbmuster auf die Gesamtsequenz der DNA möglich ist. Grundsätzlich werden bei der Sequenzierung durch Synthese keine Didesoxy-

Terminatoren verwendet, in einigen Technologien kommen jedoch reversible Terminatoren zum Einsatz. Im Unterschied zur Sanger Sequenzierung werden nur sehr kurze Fragmente parallel sequenziert, die anschließend wieder zusammengefügt werden. Das macht diese Methoden auch fehleranfälliger, je öfter die Fragmente sequenziert werden, desto höher ist die Sensitivität. Drei bekannte Sequenzierungsmethoden werden im Folgenden in Kürze beschrieben, nämlich die Pyrosequenzierung, die Ionen-Halbleiter-DNA-Sequenzierung und die Sequenzierung mit Brückensynthese.

Vereinfacht entsteht bei der Pyrosequenzierung bei Einbau des richtigen Nukleotids in den neusynthetisierten DNA-Strang ein Signal. Wird das falsche Nukleotid eingebaut, bleibt das Signal aus. Folglich gibt es spätestens ab dem vierten Einbau ein Signal. Wird zweimal hintereinander das gleiche Nukleotid eingebaut ist das Signal stärker. Die Methode basiert auf einem speziellen Enzymsystem. Bei Einbau des passenden Nukleotids wird Pyrophosphat frei, das zu ATP umgewandelt wird, wodurch wiederum Luziferin in Oxyluziferin umgesetzt wird, und einen Lichtblitz auslöst, welcher detektierbar ist. Ähnlich wird bei der Ionen-Halbleiter-DNA-Sequenzierung bei Einbau des richtigen Nukleotids ein Wasserstoffatom freigesetzt, welches den pH-Wert einer Lösung ändert und als Spannungsänderung gemessen werden kann. Die Sequenzierungsdaten werden so über eine Halbleiterchip-Detektion von besagten Ionen gewonnen.

Bei der Sequenzierung mit Brückensynthese werden DNA-Fragmente, die mit jeweils einem unterschiedlichen Adapter an beiden Seiten markiert sind, auf eine Trägerplatte aufgebracht, auf der bereits komplementäre Oligonukleotide fixiert sind. Die Oligonukleotide auf der Platte sind in einem gewissen Abstand aufgebracht, sodass die DNA-Fragmente sich „brückenartig“ von einem auf das nächste Oligonukleotid amplifizieren können. So entstehen sogenannte Cluster, die die gleiche Sequenz aufweisen. Mittels fluoreszendierendem Farbstoffs kann bei der Sequenzierung wiederum in Echtzeit die eingebaute Base bestimmt werden. (63)

1.5.3 Sequenzierung der dritten Generation

Im Gegensatz zur zweiten Generation werden hier lange DNA- und RNA-Moleküle sequenziert. Eine Sequenzierung durch vorrausgehende Amplifikation kann entfallen, wodurch Verzerrungen durch ungleichmäßige Amplifikationen auf früheren Modellen wegfallen. Als Signale fungieren unter anderem abermals Fluoreszenz und Protonen. (62)

Bei der Nanoporen Sequenzierung werden Spannungsveränderungen gemessen. Diese entstehen beim Passieren der Nukleotide durch eine winzige Pore, die durch das Einbetten von zwei Transmembranproteinen in eine Lipidmembran entstanden ist. Je nachdem welches der vier Nukleotide durch die Pore wandert, gibt es einen spezifischen Spannungsabfall, der detektiert wird und dadurch die Sequenzierung der DNA ermöglicht.

(63)

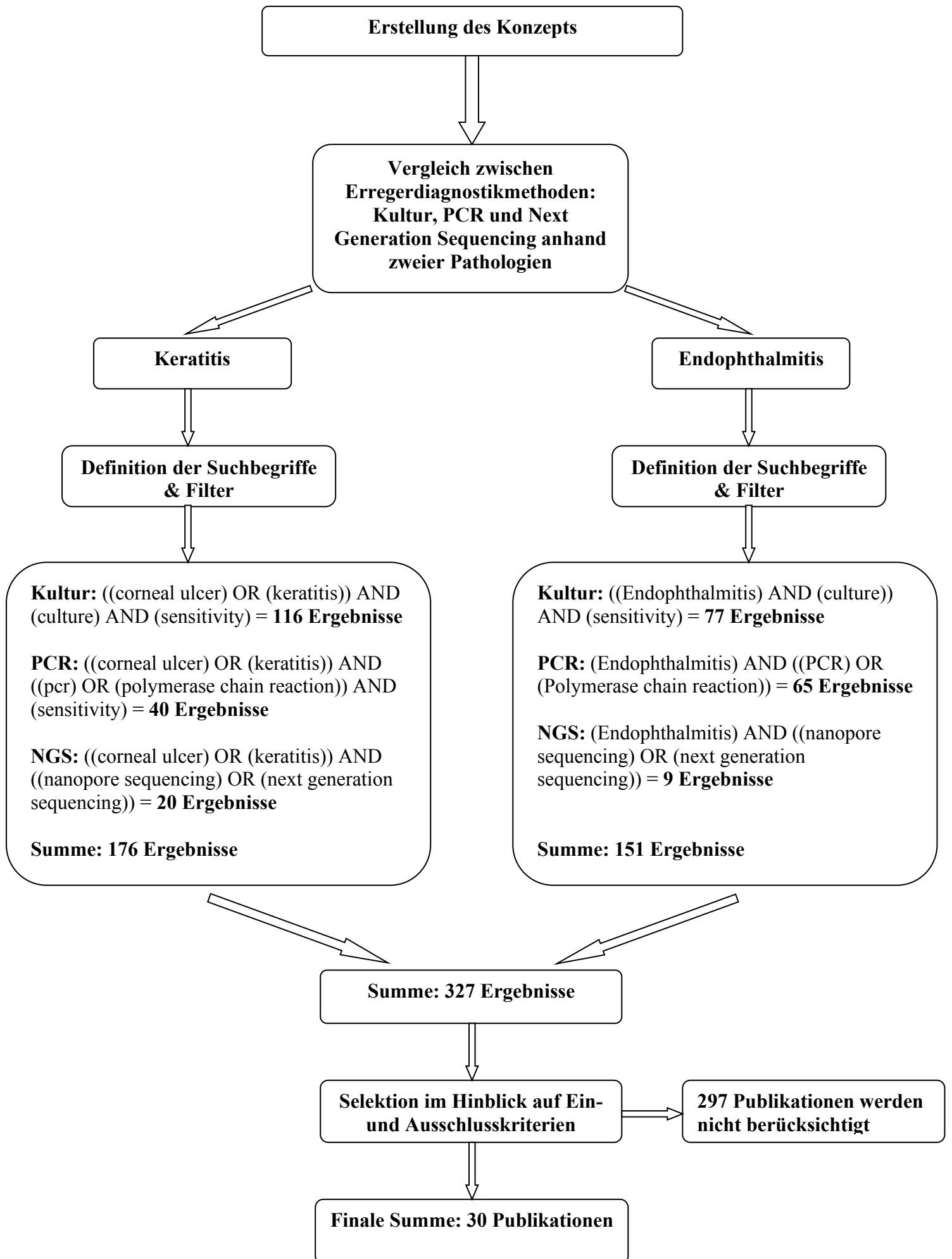
2 Material und Methoden

Das Ziel dieser Arbeit ist es einen Vergleich von Erregerdiagnostikmethoden in der Ophthalmologie auf Basis bestehender Literatur aus der medizinischen Datenbank pubmed zu schaffen. Diese Gegenüberstellung wird anhand zweier Krankheitsbilder, der Keratitis und der Endophthalmitis, erarbeitet.

Nach Rücksprache mit dem Institut für Medizinische Informatik Graz wurden geeignete Schlagworte kombiniert, um eine passende Literaturlauswahl zu treffen. Da drei Diagnostikmethoden jeweils an zwei verschiedenen Pathologien verglichen werden, wurden sechs Suchbegriffe definiert. Dabei wurde auf Synonyme geachtet. Die Keratitis wurde auch als „corneal ulcer“ gesucht, die PCR zusätzlich ausgeschrieben als „polymerase chain reaction“ und „nanopore sequencing“ als Synonym von „next generation sequencing“. Diese sechs Suchbegriffe sind im nachfolgenden Flowchart dargestellt. Zusätzlich wurde ein passender Filter für die Literatur-Recherche gewählt. Dieser schränkt einerseits die Literaturlauswahl auf die letzten fünf Jahre ein, andererseits schließt er Studien aus, die sich auf Tiere beziehen.

Die Einschränkung der Suche hat für die Diagnostikmethoden der Endophthalmitis 151 Ergebnisse, für die der Keratitis 176 Ergebnisse und in Summe 327 Ergebnisse geliefert. Von den 327 Publikationen wurde anhand des Abstracts entschieden, ob diese in die Diplomarbeit miteinfließen oder nicht berücksichtigt werden.

Arbeiten wurden ausgeschlossen, wenn keine klare Aussage und kein Rückschluss auf Sensitivität, Spezifität, Zeitaufwand, Kosten oder Verfügbarkeit zu mindestens einer Diagnostikmethode enthalten waren. Des Weiteren wurden Fallberichte ausgeschlossen. Schlussendlich blieben 30 Publikationen übrig, anhand derer ein bewertender Vergleich gezogen wurde.



3 Ergebnisse

3.1 Erregerdiagnostik bei Keratitis

3.1.1 Kultur

3.1.1.1 Sensitivität

Die Angaben zur Sensitivität der Kultur variieren je nach Literatur stark. Dies ist unter anderem auf unterschiedliche Referenzstandards zurückzuführen, die die Studien zur Berechnung verwenden, sowie auf die unterschiedlichen Erreger.

Drei Publikationen vergleichen die Kultur mit der PCR zur Diagnostik von Akanthamöbenkeratitis und liefern folglich Werte für die Sensitivität.

Die geringste Sensitivität lag bei 33,3%, als Grundlage für den Referenzstandard wurde ein positives Ergebnis in der in vivo konfokalen Mikroskopie (IVCM-), der PCR- und / oder der Akanthamöbenkulturen sowie Genesung bei Anti-Akanthamöben-Therapie gewählt.

(64)

Ein ähnlicher Referenzstandard wurde bei der zweiten Publikation gewählt, und zwar eine latente Klassenanalyse, die auf der Grundlage einer Kreuzklassifizierung der Ergebnisse von verschiedenen PCR-Assays, deren Kombinationen und den Ergebnissen der Kulturen basiert. Die ermittelte Sensitivität liegt bei 66,7% und ist damit deutlich höher als in der ersten Studie. (65)

Die dritte Studie zur Diagnostik der Akathamöbenkeratitis gibt die höchste Sensitivität für die Kultur an, diese liegt bei 81,82%. Als Referenz gelten positive Proben, die durch je zwei Verfahren, nämlich Kultur, Abstrich, cPCR oder qPCR, als positiv bestätigt wurden.

(66)

Weitere zwei Publikationen liefern Richtwerte für die Sensitivität der Kultur zur Diagnostik der Pilzkeratitis, eine liefert eine Positivrate.

Die Studie mit der niedrigsten Sensitivität bzw. Positivrate vergleicht die „nested PCR“,

eine Modifikation zur klassischen PCR, mit der Kultur. Von 59 Proben waren 24 Kultur und 38 PCR positiv. Bei 11 Proben lag ein bakterielles Wachstum vor und bei 10 Proben gar kein Wachstum. Alle kulturpositiven Proben waren auch in der PCR positiv und die PCR positiven, die in der Kultur positiv waren, sind weiter sequenziert worden. Die Positivrate wird mit 40,67% angegeben. (67)

Eine höhere Sensitivität zur Diagnostik von Pilzkeratitis mittels Kultur liegt bei 71,43% und wird in einer Studie, in der Hochdurchsatz Sequenzierung mit der Kultur, IVCN und Kaliumhydroxid (68) (KOH)-Abstrichen verglichen werden, ermittelt.

Referenz sind Proben, die allesamt durch mindestens eine der oben genannten Diagnostikmethoden als positiv getestet worden sind. (69)

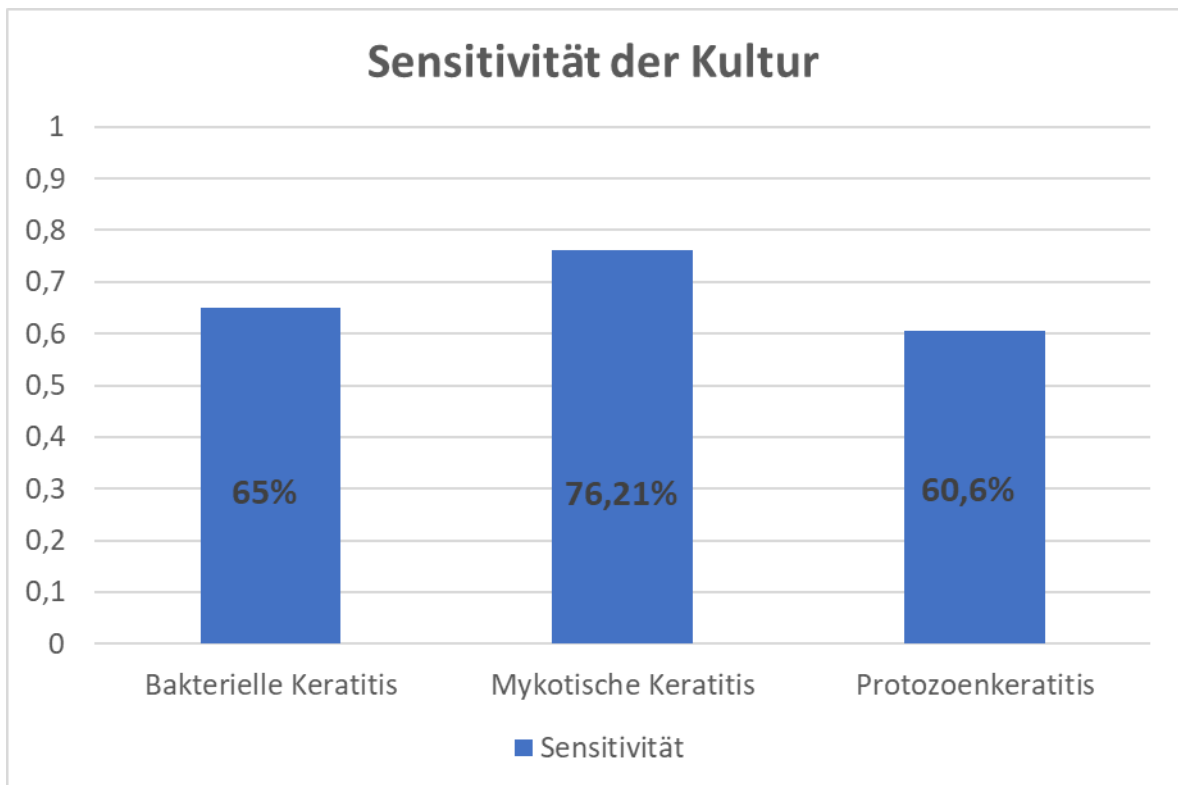
Der höchste Sensitivitätswert stammt aus einer Publikation, die ebenfalls Next Generation Sequencing mit herkömmlichen Methoden vergleicht. Hier wird die Sensitivität der Kultur mit 81% angegeben, sie wird ebenfalls mit der latenten Klassenanalyse berechnet.

Dieselbe Studie hat für die Sensitivität der Kultur nach gleichen Kriterien einen Wert von 75% ermittelt, diesmal zur Diagnostik von bakterieller Keratitis. (70)

In weiteren Publikationen, die sich primär mit anderen Diagnostikmethoden befassen, werden Sensitivitätswerte nur zitiert. Diese liegen für bakterielle Keratitis und Pilzkeratitis zwischen 40% und 70%. (71)

Zwei Studien, die allerdings vom selben Autor stammen, zitieren die Sensitivität allgemein für die Kultur bei mikrobieller Keratitis mit 50%. (68, 72)

Das folgende Balkendiagramm verbildlicht die Durchschnittswerte der Sensitivität der Kultur zu den unterschiedlichen Erregern, die sich aus der Literaturrecherche berechnen ließen.



Durchschnittswerte der untersuchten Studien für die Sensitivität der Kultur bei Keratitis

3.1.1.2 Spezifität

Während die Sensitivität in den einzelnen Publikationen und von Erreger zu Erreger variiert, sind die Angaben für die Spezifität viel eindeutiger. In allen drei Studien zur Akanthamöbenkeratitis wird die Spezifität mit 99,9% bzw. 100% beschrieben. Die Referenzstandards sind die gleichen wie bei der Ermittlung der Sensitivität. (64) (65) (66) In der Publikation, in der NGS mit der Kultur verglichen wird, liegt die Spezifität der Kultur für die bakterielle Keratitis ebenfalls bei 100% und die für die mykotische Keratitis bei 96%. (70)

Auch weitere Studien, die zwar keinen direkten Prozentsatz ermitteln, beschreiben die Spezifität als sehr hoch. (67)

3.1.1.3 Dauer der Kultivierung

Die richtige Behandlung ist vom Erreger abhängig und muss frühestmöglich erfolgen, daher ist auch der Zeitfaktor für die Kultivierung relevant.

In der Literatur finden sich wenige exakte Zeitangaben, oft wird die Kultur für 14 bis 21 Tage angelegt und täglich überprüft. Bei der Akanthamöbenkeratitis wird die mittlere Dauer mit 10 Tagen (65) angegeben, was die beiden anderen Studien zur Protozoenkeratitis ungefähr bestätigen. Hier wird die Kultivierungsdauer mit „länger als eine Woche“ beschrieben. (64) (66)

Die Zeitspanne für die Kultivierung der Pilzkeratitis ist ähnlich und wird mit 5-14 Tagen (67) beziffert. Zu dem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie, die die mittlere Dauer der mykotischen Keratitis mit 6 Tagen angibt. (69)

Das Anlegen der Kultur bei der bakteriellen Keratitis unterscheidet sich geringgradig von den anderen und wird mit zwei Tagen bis zwei Wochen beschrieben. (71)

Grundsätzlich lässt sich zusammenfassen, dass die Kultur recht zeitaufwändig ist. In der Praxis hängt die Dauer zu einem großen Teil von der Verfügbarkeit des Labors ab. Wenn die Probe freitagnachmittags eingeschickt wird, kann sich die Diagnostik erheblich verzögern.

3.1.1.4 Kosten

Zu den Kosten gibt es wenig bis keine Aussagen, die einzige Angabe wird mit zwei Dollar pro Isolat beziffert. (66) Zum Vergleich wurden die Tarifkosten vom Institut für Hygiene der medizinischen Universität Graz angefragt, das die Kosten für die Bakterienkultur mit 26 Euro, für die Pilzkultur mit 23,30 Euro und für das Antibiogramm mit 22 Euro beziffern.

3.1.2 PCR

3.1.2.1 Sensitivität

Die Werte für die Sensitivität der PCR variieren ebenfalls, wenn auch weniger als bei der Kultur. Das ist unter anderem auf die unterschiedlichen Assays und die verwendeten unterschiedlichen Referenzstandards zurückzuführen. Drei Publikationen ermitteln die Sensitivität für die PCR bei Protozoenkeratitis. Die Ergebnisse liegen bei 66,7% bis 75% (64), 73,3% bis 86% (65) und in der dritten Studie erreicht sie sogar 100%. (66) Als Referenz dient wie bei der Kultur eine positive konfokale Mikroskopie, PCR oder Kultur, sowie Besserung nach Anti-Akanthamöbentherapie, oder eine latente Klassenanalyse. Die erste und dritte Studie ermitteln die Sensitivität für die konventionelle und die Real-time PCR, die zweite vergleicht fünf PCR Assays miteinander, die alle eine Sensitivität im Bereich von 73,3 bis 86% aufweisen. Bei Kombination der PCR Assays wird sogar eine Sensitivität von 93,8% bis 100% erreicht.

Bei der bakteriellen Keratitis findet sich leider kein Sensitivitätswert für die PCR, bei der Pilzkeratitis liefert nur eine Publikation eine Positivrate von 64,4%. In der PCR waren 38 von 59 Proben positiv, allerdings waren 11 von 59 Proben in der Kultur positiv auf bakterielles Wachstum. Es ist in dieser Studie also davon auszugehen, dass die Sensitivität höher als die beschriebene Positivrate liegt. (67)

3.1.2.2 Spezifität

Unabhängig vom Erreger wird die Spezifität, egal ob bei der bakteriellen, mykotischen oder Protozoenkeratitis als sehr hoch beschrieben. Die drei Publikationen, die sich mit der Akanthamöbenkeratitis befassen ermitteln eine Spezifität von annähernd 100%. Für die bakterielle wird sie ebenfalls mit 100% und für die Pilzkeratitis mit 96% (70) bzw. mit 100% (73) bei Multiplex-PCR angegeben.

3.1.2.3 Dauer des PCR-Verfahrens

Die Auswertung mittels PCR beansprucht meist nur wenige Stunden. Für die konventionelle PCR wird sie mit 3-4 Stunden beziffert, die Real-Time PCR benötigt 2,5

bis 3 Stunden. (66) Die Studie zur Pilzkeratitis kommt mit 6 Stunden Auswertungszeit auf ein ähnliches Ergebnis. (67)

Andere Studien beschreiben die Dauer bis zum Erhalt des Ergebnisses, was aber vom Labor und dessen Verfügbarkeit abhängig ist. Die Dauer bis zum Erhalt beläuft sich dann auf wenige Tage (64), sie wird mit zwei bis maximal acht Tagen angegeben. (65) Auf jeden Fall ist die Auswertungszeit um einiges geringer als bei der Kultur.

3.1.2.4 Kosten

Zu den Kosten finden sich wenige Anhaltspunkte in der Literatur. Eine Publikation beschreibt die Kosten mit 7 Dollar pro Isolat für die konventionelle und 14 Dollar pro Isolat für die Real-Time PCR.

3.1.3 Next Generation Sequencing

3.1.3.1 Sensitivität

Next Generation Sequencing hat grundsätzlich eine recht hohe Sensitivität. Das lässt sich auch der Literatur entnehmen, in der die Sensitivität von 74% bis 100% beschrieben wird. Die höchste Sensitivität wird NGS in einer bereits angeführten Studie zugeschrieben, die einen Vergleich zur Kultur zieht und sowohl für die bakterielle als auch für die mykotische Keratitis, eine Sensitivität von 100% ermittelt. (70) Für eine ähnlich hohe Sensitivität spricht die Positivrate einer Studie zu NGS bei bakterieller Keratitis von 98,4%. (74) In einer weiteren Publikation zur Pilzkeratitis wird die Sensitivität von NGS mit 74,29% vergleichsweise geringer ermittelt. (69)

Ein 16s-18s-NGS-Assay ermittelt für die Diagnostik von Akanthamöbenkeratitis eine Sensitivität von 88%, als Referenz werden positive Real-Time PCR Proben herangezogen. (75)

3.1.3.2 Spezifität

Die Spezifität ist gleich wie bei den anderen Diagnostikmethoden beinahe 100%. Fast alle eben zitierten Studien beschreiben sie mit 100%, eine Ausnahme ermittelt eine Spezifität von 97%. (70)

3.1.3.3 Sequenzierungsdauer bei NGS

In einer Übersichtsarbeit zu NGS werden 13 Sequenzierungstechnologien angeführt, die eine Sequenzierungsdauer von 0,5 Stunden bis 14 Tagen haben. Allerdings beläuft sich die Dauer bei 9 von 13 NGS-Technologien auf unter 48 Stunden, und bei 6 von 13 auf unter 24 Stunden. Je nach der Anzahl an Durchläufen benötigt NGS 3,5 bis 4 Tage. (71)

Eine weitere Publikation zur Kultur und NGS beschreibt eine Dauer von 7 Tagen, bis die Rohdaten verfügbar sind. (69)

Hier muss berücksichtigt werden, dass die unterschiedlichen NGS Techniken unterschiedlich lange Sequenzierungsdauern aufweisen. Die gesamte Sequenzierungsdauer ist auch nicht gleichzusetzen mit der Sequenzierungsdauer bis zur Feststellung des Erregers. Diese gelingt in der Regel für NGS Varianten innerhalb von wenigen Stunden.

3.1.3.4 Kosten

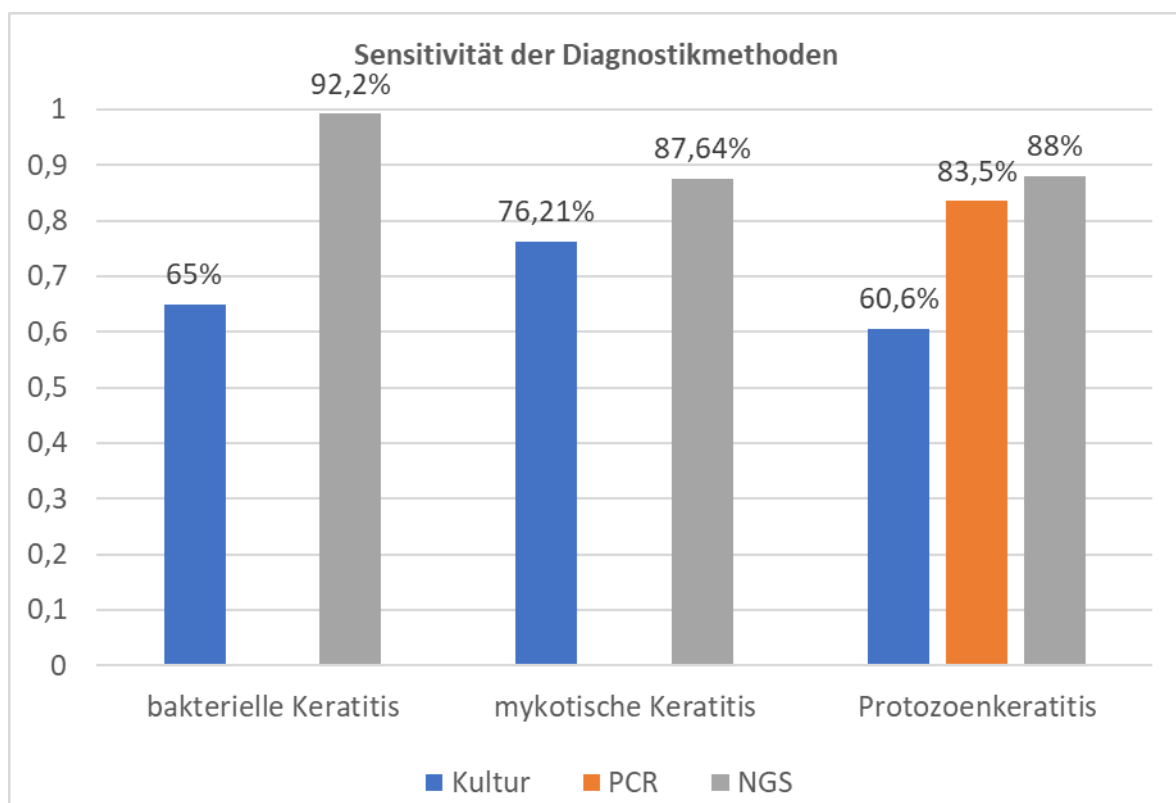
Zu den Kosten ist keine exakte Aussage zu finden, in einer Publikation wird NGS als unerschwinglich teuer beschrieben. (68)

3.1.4 Vergleich der Diagnostikmethoden

3.1.4.1 Sensitivität

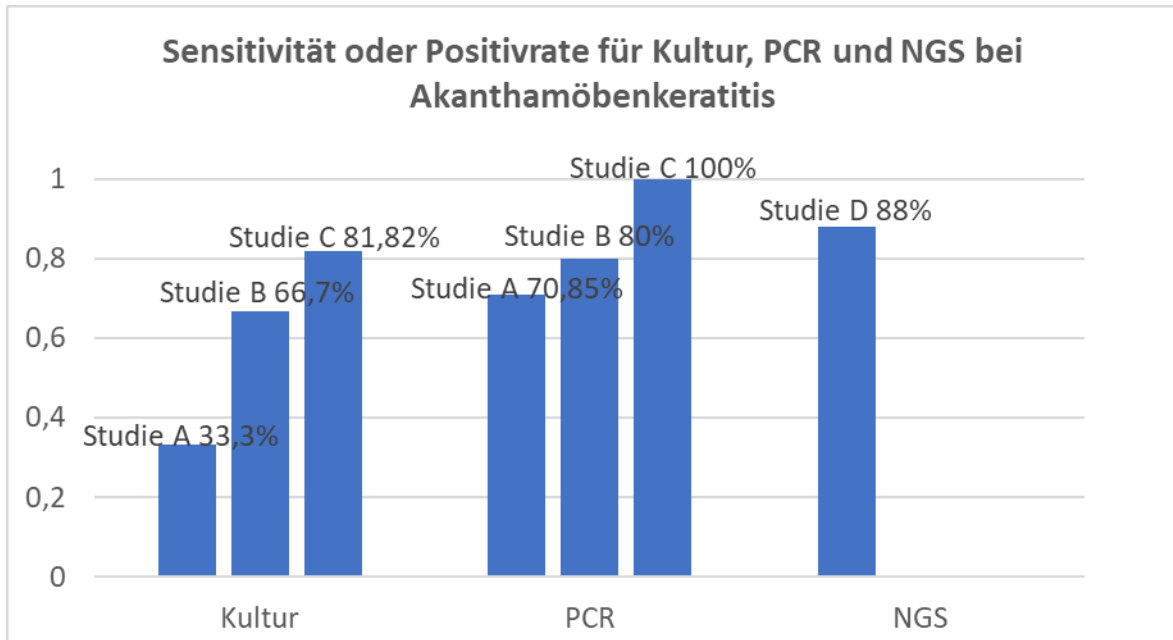
Die Sensitivität der Diagnostikmethoden ist bei NGS klar am höchsten. Dabei macht es keinen Unterschied, ob es sich um die bakterielle, mykotische oder Akanthamöbenkeratitis handelt.

Mögliche Erklärungen für die vergleichsweise niedrigere Sensitivität bei der Kultur sind vorangegangene antibiotische bzw. antimykotische Therapien, unzureichende Probenahmen oder geringe Probengrößen, das Vorhandensein von nicht lebensfähigen Organismen, sowie das Vorhandensein einer kleinen Anzahl von Keimen zu Beginn der Infektion. (64) PCR und NGS können den Erreger hingegen auch bei geringerer Probenmengen identifizieren, wobei NGS der PCR in den untersuchten Studien überlegen ist. Dies hat wiederum zur Folge, dass NGS und PCR anfälliger für Verunreinigungen sind. Das nachfolgende Balkendiagramm, in dem die Durchschnittswerte aus den behandelten Publikationen verwendet wurden, soll diesen Unterschied verbildlichen. In der behandelten Literatur finden sich keine Werte für die Sensitivität der PCR für die bakterielle und die mykotische Keratitis. Anhand der Positivraten ist aber davon auszugehen, dass diese Werte ähnlich der Sensitivität der Protozoenkeratitis sind.



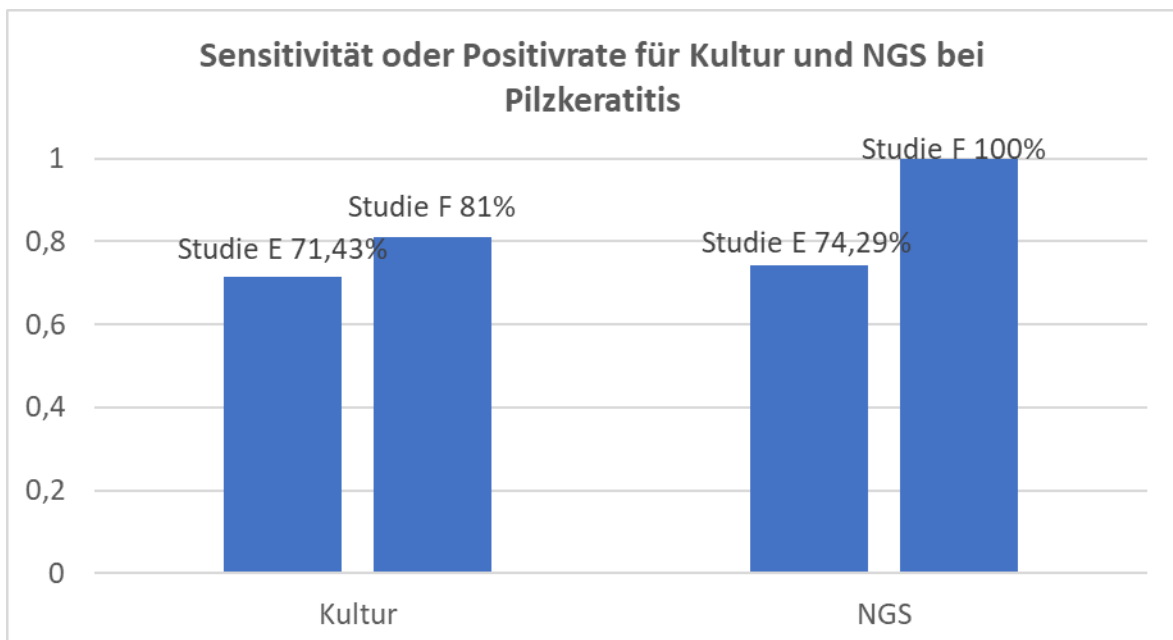
Durchschnittswerte für die Sensitivität der Diagnostikmethoden bei Keratitis in den untersuchten Studien

Folgende Balkendiagramme stellen die Werte einzelner Studien für die Sensitivität bzw. Positivraten von der bakteriellen, mykotischen und der Akanthamöbenkeratitis dar. Wurden in Studien Wertebereiche angegeben, wurde für die Grafik der Mittelwert berechnet. Auch hier kann man für alle drei Krankheitsbilder den klaren Vorteil in der Sensitivität zu Gunsten vom NGS erkennen.

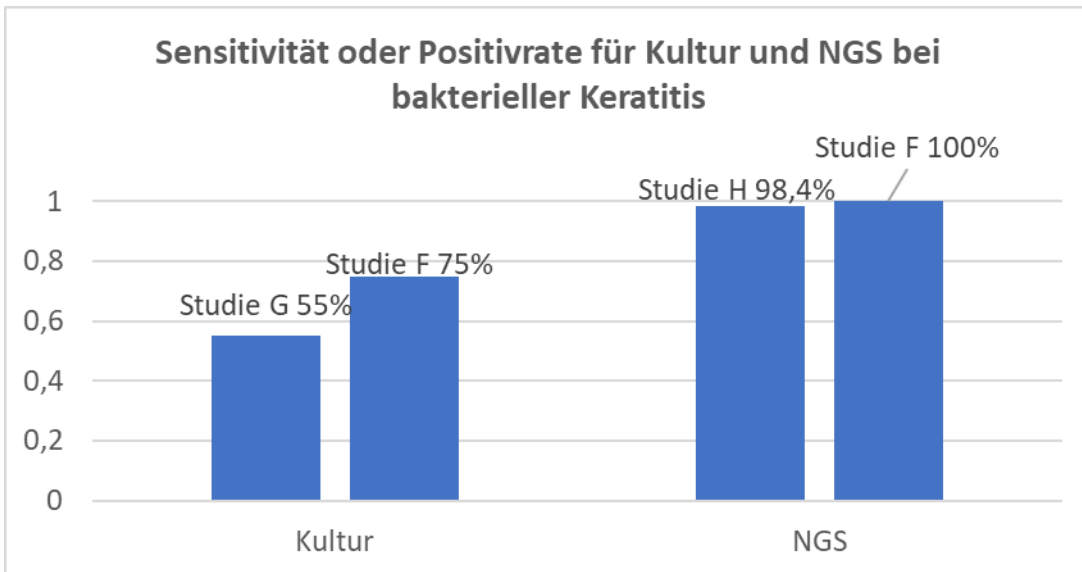


Studie A: Goh et al. (2018)
Studie B: Yera et al. (2020)

Studie C: Megha et al. (2021)
Studie D: Holmgaard et al. (2021)



Studie E: Ren et al. (2020)
Studie F: Lalitha et al. (2020)

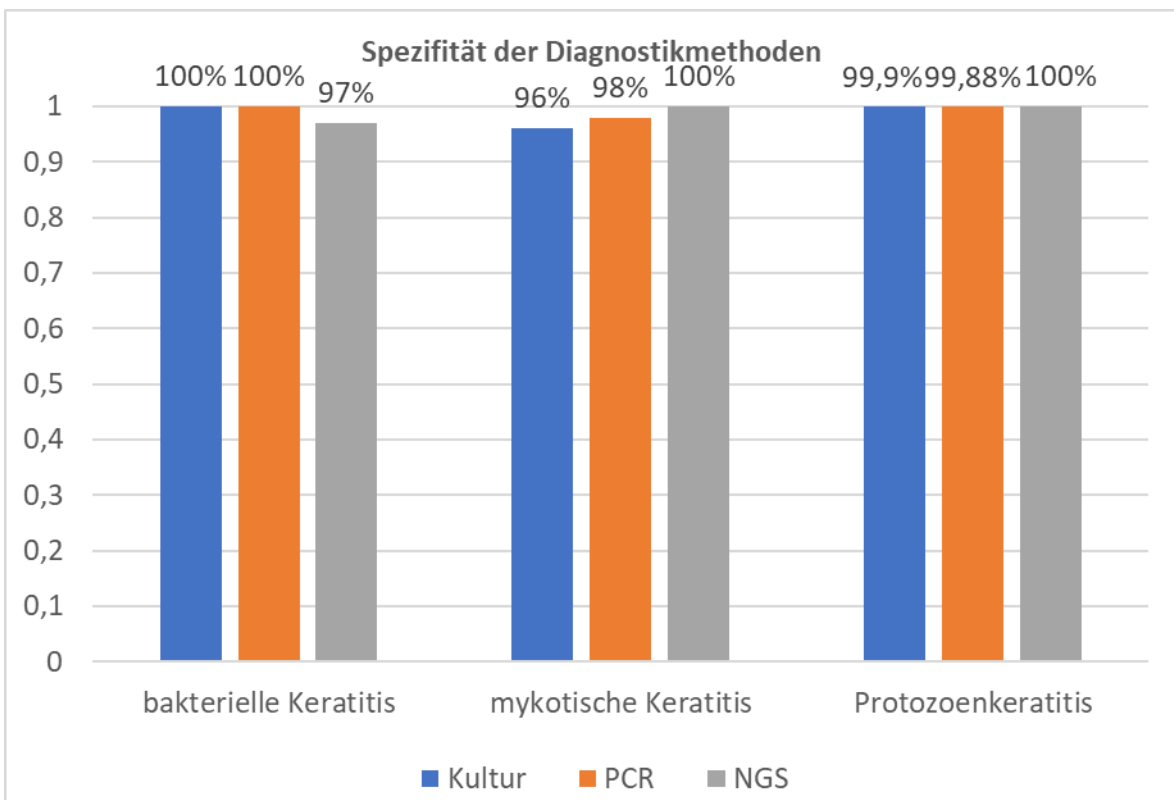


Studie F: Lalitha et al. (2020)
 Studie G: Ma et al. (2019)

Studie H: Ren et al. (2021)

3.1.4.2 Spezifität

Alle Diagnostikverfahren erzielen eine sehr hohe Spezifität, die nahezu an die 100% reicht. Falsch positive Ergebnisse sind daher sehr gering. Folgende Grafik zeigt diesen Vergleich.

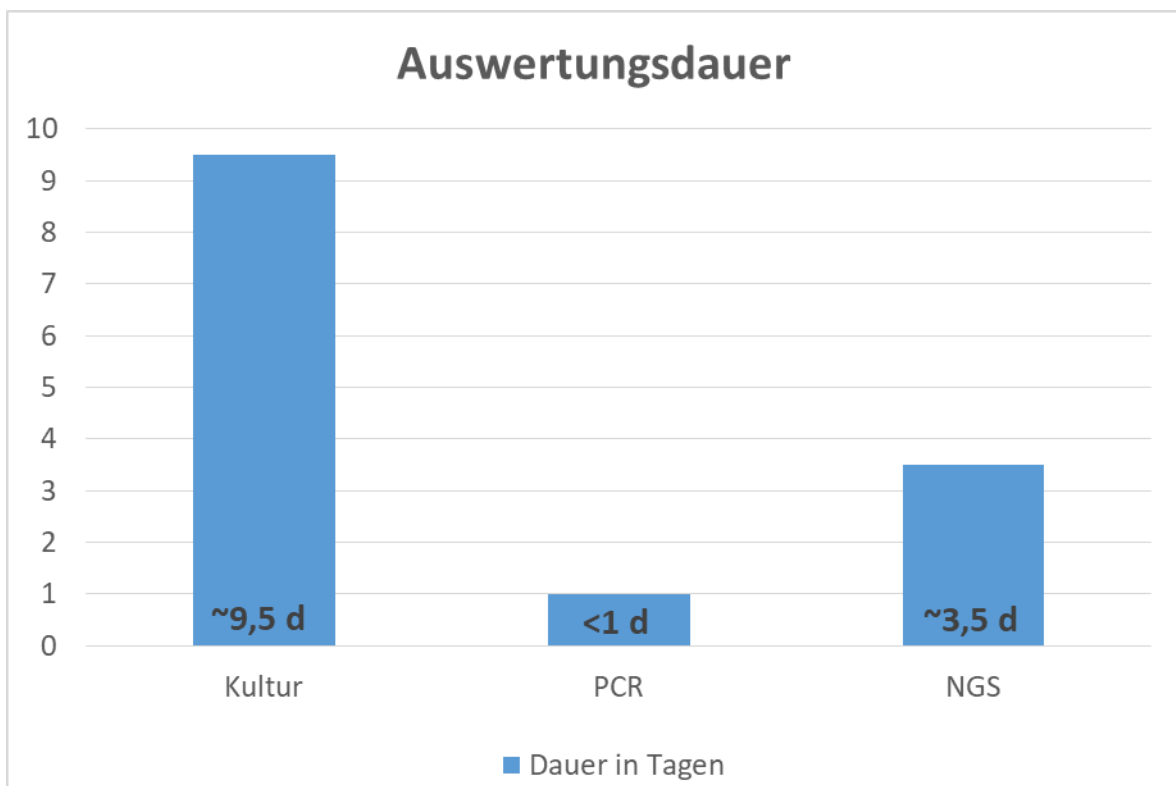


Durchschnittswerte für die Spezifität der Diagnostikmethoden bei Keratitis in den untersuchten Studien

3.1.4.3 Dauer

Die Dauer der Auswertung ist für die Keratitis relevant, um rasch die richtige Therapie einzuleiten und schwerwiegende Komplikationen zu vermeiden. Die Kultivierungszeit ist definitiv am längsten und dauert wenige Tage bis zwei Wochen. Doch auch die Sequenzierungszeit bei NGS kann bis zu wenigen Tagen in Anspruch nehmen. Am besten schneidet die PCR mit einer Auswertungsdauer von wenigen Stunden ab. Die Auswertungsdauer variiert je nach Erreger, Keimlast und zuvor eingeleiteter antibiotischer Therapien. Den größten Einflussfaktor bis zum Erhalt des Ergebnisses hat aber die Wahl der richtigen Diagnostikmethode.

In der nachfolgenden Grafik ist die Durchschnittsdauer von allen, sprich bakterieller, mykotischer und Protozoenkeratitis dargestellt.



Durchschnittswerte für die Auswertungsdauer der Diagnostikmethoden bei Keratitis in den untersuchten Studien

3.1.4.4 Kosten

Leider gibt es nur wenige Publikationen, die Stellung zu den Kosten beziehen. Trotzdem gilt, dass die Kultur am günstigsten ist, während die PCR und NGS aufgrund des technischen Aufwands und der Auswertung um einiges kostspieliger sind.

3.1.5 Schlussfolgerungen

Die Kultur ist am kostengünstigsten, gut verfügbar und in Zusammenhang mit der Klinik eine bewährte Diagnostikmethode. Es ist davon auszugehen, dass sie in den nächsten Jahren der Goldstandard zusammen mit dem Abstrich und gegebenenfalls noch mit der PCR bleibt.

In einigen Studien wird geschlussfolgert, dass PCR (67) aber auch NGS als Ergänzung zur konventionellen Kultur verwendet werden kann. Insbesondere wenn sich Erreger nicht züchten lassen, die Antibiose nicht anschlägt (76) oder schwer kultivierbare Erreger vorliegen. Dann könnten zusätzlich sensitivere Diagnostikmethoden eingesetzt werden.

Noch besser wäre es, wenn in solchen Fällen direkt zu den sensitiveren Diagnostikmethoden gegriffen würde. Dies spart Zeit und vermeidet gegebenenfalls kostspielige Komplikationen und weitere Eingriffe. Dazu könnte beispielsweise ein Score oder ein Algorithmus, welcher die genannten Faktoren berücksichtigt und die Entscheidungsfindung der richtigen Diagnostikmethode erleichtert, entwickelt werden.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Fähigkeit von NGS innerhalb kürzester Zeit ein ganzes Genom zu sequenzieren. Abgesehen von spezifischer Erregerdiagnostik wird es durch NGS möglich sein, das gesamte Augenmikrobiom zu analysieren, dessen Gleichgewicht diagnostisch von hohem Wert ist. Dies ist Gegenstand der derzeitigen Forschung. (77)

Aller Wahrscheinlichkeit nach wird das nicht nur für Infektionskrankheiten von Relevanz sein, sondern sehr viele Bereiche in der Ophthalmologie betreffen.

Zusätzlich zu bemerken ist, dass NGS eine relativ junge Technik ist, die ständig weiterentwickelt wird. Es ist davon auszugehen, dass es mit der Zeit auch preislich attraktiver wird.

Obwohl NGS vielversprechend klingt, gibt es vom aktuellen Standpunkt aus gesehen einige Nachteile. Die Verfügbarkeit ist noch stark limitiert und die Kosten sind vergleichsweise hoch.

Es bleibt abzuwarten, wie sich diese neuartige Methode entwickelt, der diagnostische Wert ist jedenfalls hoch einzustufen.

3.2 Erregerdiagnostik bei Endophthalmitis

3.2.1 Kultur

3.2.1.1 Sensitivität

Alle ausgewählten fünfzehn Publikationen beschäftigen sich mit dem diagnostischen Wert der Kultur. Im Gegensatz zur Literatur zur Keratitis liefern nur zwei Studien konkrete Zahlen für die Sensitivität. Die restlichen führen Positivraten an, die auf die Sensitivität rückschließen lassen.

Auch wenn die Positivrate nicht mit der Sensitivität gleichzusetzen ist, stellt sie gewissermaßen einen Richtwert dar, der einen Vergleich mit anderen Diagnostikmethoden ermöglicht. Des Weiteren besteht bei dem Patientengut in allen Studien ein hochgradiger klinischer Verdacht auf Endophthalmitis, wodurch man davon ausgehen kann, dass die Positivrate nicht allzu weit von der zu ermittelnden Sensitivität divergiert.

In der einen Studie wird NGS mit der Kultur anhand von Glaskörperproben bei Patienten und Patientinnen mit klinischem Verdacht auf Endophthalmitis verglichen. 15 von 34 Proben waren in der Kultur positiv und in allen kulturpositiven Proben werden auch Erreger durch NGS nachgewiesen. Die Sensitivität beläuft sich auf 44%. (78)

In der zweiten Studie werden Kammerwasser- und Glaskörperproben, ebenfalls bei Patienten und Patientinnen mit klinischem Verdacht, kultiviert. Als richtig positiv werden Ergebnisse gewertet, die einen positiven Test haben, sowie bei denen die auf eine Antibiotika Therapie ansprechen. Falsch negativ sind Proben, die einen negativen Test liefern und bei denen die Patient und Patientinnen trotzdem auf die Antibiotika Therapie ansprechen. Nachdem ausnahmslos alle auf die Therapie ansprechen, wird jedes negative Testergebnis als falsch negativ gewertet. Nach dieser Methode ergibt sich eine Sensitivität für die Kultur von 20%, 6 von 30 Proben sind positiv. (79)

Die Positivraten bewegen sich in einem Bereich von 17,7% bis zu 75%. Die Streuweite des Bereichs lässt sich unter anderem auf unterschiedliche Studienkonstellationen zurückführen, wie Art der Proben, nämlich von Glaskörper oder Kammerwasser,

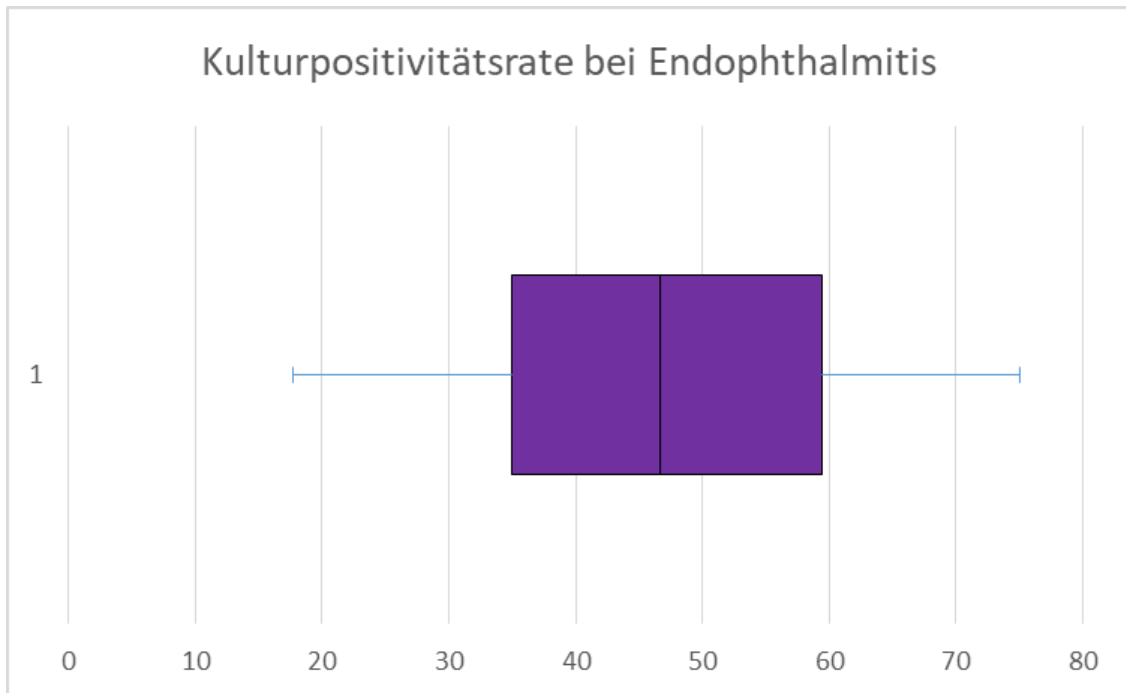
Keimzahlen, Anzahl der Proben und vorausgegangene Antibiotika Therapie. Auch die Art des Erregers spielt bei der Kultivierung eine Rolle. Pilze werden seltener detektiert als Bakterien.

Die Studie mit der geringsten Kulturpositivität beschäftigt sich mit der Diagnostik von *Pseudomonas aeruginosa*. 8 von 45 Proben, also 17,7% sind insgesamt kulturpositiv. Beschränkt man sich auf die Diagnostik von *P. aeruginosa* sind es nur 15,4%, allerdings bei einer viel kleineren Probenmenge von 13 Proben. (80) Auch der obere Grenzwert des Bereichs der Positivrate mit 75% stammt aus einer Studie mit einer sehr kleinen Ausgangsmenge von 8 Proben. (81)

Eine Publikation zum Erregerspektrum bei postoperativer Endophthalmitis hat die größte Probenanzahl, 195 von 418, also 46,7% der Proben waren kulturpositiv. (82) Ebenfalls Studien mit großer Anzahl an Proben kommen auf 45% bei 60 von 133 (83), oder 30,76% bei 60 von 195 kulturpositiven Proben. (84) Meistens bewegt sich die Anzahl aber zwischen 20 und 50 Proben, vor allem dann, wenn Diagnostikmethoden miteinander verglichen werden. So beträgt die Positivrate 60,9% bei einer Probenmenge von 41, in einer Studie die den diagnostischen Wert von Laktatwerten mit der Kultur vergleicht (85), bzw. 59,4% bei einer Studie, die das Erregerspektrum bei posttraumatischer Endophthalmitis erforscht und eine Probenanzahl von 32 aufweist. (86)

Des Weiteren stellen drei Publikationen fest, dass auch wenn Kammerwasserproben leichter zu gewinnen sind als Glaskörperproben, die Ausbeute an positiven Kulturergebnissen um einiges besser bei Glaskörperproben ist. (81, 83) Dies ist auch dann der Fall, wenn vor der Kultivierung mit Antibiotika behandelt wurde. (87)

Das nachfolgende Boxplot dient der Veranschaulichung der Positivraten. Der Median liegt bei 46,7%, Q1 beträgt 35%, Q3 59,4%, Minimum und Maximum wurden oben beschrieben. Von den fünfzehn Publikationen liefern dreizehn (n=13) Positivraten.



(n=13, Min: 17,7%; Q1: 35%; Median: 46,7%; Q3: 59,4% Max: 75%; Studien C-O)

Studie C: Mishra et al. (2019)

Studie D: Kosacki et al. (2019)

Studie E: Selva et al. (2021)

Studie F: Dong et al. (2021)

Studie G: Jun et al. (2021)

Studie H: Huang et al. (2021)

Studie I: Naik et al. (2019)

Studie J: Tanaka et al. (2019)

Studie K: Kehrmann et al. (2018)

Studie L: Feng et al. (2020)

Studie M: Xu et al. (2019)

Studie N: Mitra et al. (2021)

Studie O: Teng et al. (2016)

3.2.1.2 Spezifität

Die Spezifität der Kultur bei Endophthalmitis ist sehr hoch. In keiner einzigen Studie wird ein falsch positives Testergebnis beschrieben. In der bereits zitierten Studie, in der die Kultur mit NGS verglichen wird, beträgt die Spezifität 100%. In diesem Fall wird die klinische Diagnose einer Endophthalmitis als Referenz herangezogen. (78)

Ebenso beziffert eine weitere Publikation die Spezifität der Kultur mit 100%. (79) In einigen Studien, in denen die Kultur mit anderen Diagnostikmethoden verglichen wird, ist die Spezifität zwar nicht explizit angeführt, es lässt sich jedoch trotzdem auf eine an 100% grenzende Spezifität schließen, da alle positiven Kultur Ergebnisse auch in den anderen Diagnostikmethoden positiv sind. (81, 84, 88, 89)

3.2.1.3 Dauer der Kultivierung

Gerade bei der Endophthalmitis ist der Zeitfaktor der Diagnostik wesentlich, um schwere Komplikationen zu vermeiden. Auch hier haben vor allem die Art des Erregers, sowie die Keimlast einen großen Einfluss. In den meisten Fällen wird die Kultur für zwei bis drei Wochen auf Blut-, Schokolade-, Thioglykolat-, oder Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten gezüchtet.

In der Literatur variiert die mittlere Kultivierungsdauer stark. Am kürzesten wird sie in einer Publikation mit zwei bis drei Tagen für Pilze und Bakterien angegeben. (90) Eine zweite Studie bestätigt dies, beschreibt aber auch Zeiträume von bis zu drei Wochen. (81) Es werden auch exakte Werte von mittleren Dauern angegeben, wie $5,39 \pm 0,56$ Tage, (91) was sich mit einer beschriebenen Dauer von vier bis fünf Tagen aus einer weiteren Publikation deckt. (78)

Zwei Studien beschreiben die Kultivierungsdauer mit zirka sieben Tagen. (79, 92)

Die Kultur ist ein zeitaufwendiges Verfahren, das zusätzlich von den Öffnungszeiten der Labors abhängig ist.

3.2.1.4 Kosten

Nur eine einzige Studie liefert mit 25 Dollar pro Isolat einen Richtwert. (78) Dies ähnelt dem Vergleich mit dem Institut für Hygiene der Medizinischen Universität Graz, welches die Kosten für die Bakterienkultur mit 26 €, für die Pilzkultur mit 23,30 € und für das Antibiogramm mit 22 € beziffert.

3.2.2 PCR

3.2.2.1 Sensitivität

Die Datenlage zur PCR in der Literatur ist ähnlich der Kultur. Fünf von fünfzehn Publikationen behandeln den diagnostischen Wert der PCR bei Endophthalmitis, in einer Publikation wird die Sensitivität beschrieben, die anderen vier ziehen Vergleiche anhand der Positivraten.

Die Sensitivität wird in einer Arbeit ermittelt, die die qPCR mit der Kultur vergleicht. Von 30 Proben werden 26 durch die qPCR als positiv erkannt, da jedes negative Ergebnis als falsch negativ eingestuft wird, liegt die Sensitivität bei 85%. (79)

Eine weitere Studie beschäftigt sich mit der qPCR und vergleicht die Positivrate von Kammerwasser- und Glaskörperproben. Gleich wie bei der Kultur ist die Ausbeute bei Glaskörperproben deutlich besser mit 63% versus 30% bei Kammerwasser. (87) Eine sehr niedrige Positivrate gibt es bei der *Pseudomonas aeruginosa* Diagnostik mit einer Positivrate von 13,3%. (80)

In der Studie mit der größten Anzahl an Proben erreicht ein Breitband-PCR-Test, der auf die 16S rRNA-Region von Bakterien abzielt, eine Positivrate von 65,13% bei 195 Glaskörperproben. (84) Ein PCR-Assay das ebenfalls 16s Regionen bei Bakterien, bzw. 28s Regionen bei Pilzen detektiert, erreicht 34% bei einer Größe von 88 Proben. (88)

3.2.2.2 Spezifität

Keine der Publikationen liefert einen expliziten Wert für die Spezifität der PCR. Eine einzige beschreibt, dass es keine falsch positiven Ergebnisse gibt. Es ist daher davon auszugehen, dass die Spezifität in dieser Studie an 100% grenzt. (87) Des Weiteren werden auch in den anderen Studien keine falsch positiven Werte erwähnt. Bei den Patient*innen besteht hingegen in allen Studien der klinische Verdacht bzw. die klinische Diagnose auf Endophthalmitis. Auch in diesen Fällen ist eine an 100% grenzende Spezifität anzunehmen.

3.2.2.3 Dauer des PCR-Verfahrens

Die Auswertung der PCR beläuft sich meistens nur auf wenige Stunden. Auch hier spielt die Verfügbarkeit des Labors eine wichtige Rolle. Die längste Dauer von 36 Stunden benötigt die qPCR in einer Studie zur Detektion von Erregern bei exogener und endogener Endophthalmitis. (79) Bei der 16s spezifischen Breitband PCR wird die Dauer mit unter 24 Stunden beschrieben. (84) Die schnellste Diagnostikzeit liefert eine quantitative Real-Time-PCR zur Auswertung von postoperativer Endophthalmitis. Diese beträgt nur ein bis zwei Stunden. (87)

3.2.2.4 Kosten

In der ausgewählten Literatur gibt es nur eine Angabe, die die Kosten betrifft. Diese werden mit 25 Dollar pro Probe beziffert. (79)

3.2.3 Next Generation Sequencing

3.2.3.1 Sensitivität

Drei Publikationen befassen sich mit der Sensitivität bzw. Positivrate von Next Generation Sequencing bei Endophthalmitis. Alle drei vergleichen die Ergebnisse mit denen der Kultur.

Eine Studie berichtet über die Sensitivität und beziffert sie mit 88%. Sequenziert werden Glaskörperproben von Patient*innen mit klinischem Verdacht auf Endophthalmitis. 30 von 34 Proben detektierten den Erreger. (78)

Die anderen zwei Publikationen liefern Positivraten, nämlich 94,4% und 100%, die damit noch höher liegen als die vorhin besprochene Sensitivität. Bei der hundertprozentigen Positivrate ist allerdings die Probenmenge mit einer Anzahl von 8 relativ gering. (81) Mit einem Nachweis von 17 von 18 Proben weist die andere Studie zwar eine mehr als doppelt so hohe Probenzahl auf, kommt jedoch auf eine ähnliche Positivrate. (89)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse für eine sehr hohe Sensitivität sprechen.

3.2.3.2 Spezifität

Neben der Sensitivität wird auch die Spezifität in der Studie mit den Glaskörperproben bei Patient*innen mit klinischem Verdacht auf Endophthalmitis beschrieben und mit 100% beziffert. (78) Bei den anderen beiden Studien gibt es keinen Hinweis auf falsch positive Tests. Ein hoher Anteil an positiven NGS Ergebnissen wird von positiven Kulturergebnissen bestätigt, alle Teilnehmer*innen weisen klinische Zeichen einer Endophthalmitis auf. (81, 89)

3.2.3.3 Sequenzierungsdauer bei NGS

Die Durchlaufzeit beträgt einige Stunden bis wenige Tage. Diese hängt unter anderem von der Sequenzierungsart ab.

Es wird eine Durchschnittsdauer einer Nanopore-Sequenzierung von 8 Stunden (81), sowie die durchschnittliche Dauer einer weiteren Nanopore-Sequenzierung bis zum Erhalt der Ergebnisse von 12 Stunden (89) beschrieben. Die längste Durchlaufzeit einer vollständigen NGS-Analyse wird bei einer Illumina Sequenzierung mit vier bis fünf Tagen angegeben.

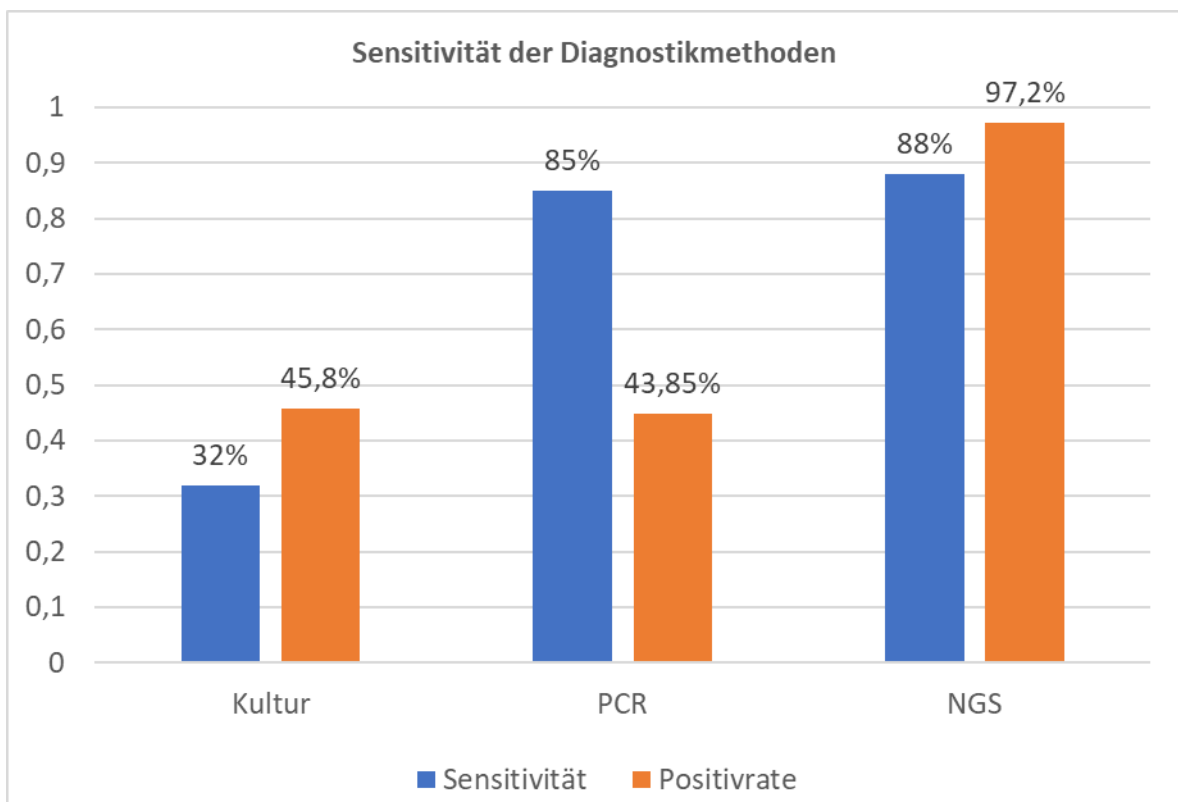
3.2.3.4 Kosten

Nur eine Publikation beschreibt die Kosten für die Sequenzierung einer Probe und beziffert diese mit 90 Dollar pro Probe. (78)

3.2.4 Vergleich der Diagnostikmethoden

3.2.4.1 Sensitivität

Von den drei untersuchten Diagnostikmethoden hat NGS sowohl die höchste Sensitivität als auch die höchste Positivrate. Darauf folgt die PCR, die in fast allen Studien sensitiver als die Kultur ist. Nur eine Publikation beschreibt in ihren Ergebnissen, dass die Kultur bei der Diagnostik von *P. aeruginosa* minimal sensibler mit 13,3% versus 17,7% ist. (80) NGS liefert auch dann positive Tests, wenn die Erregerlast durch die Probenentnahme oder vorausgegangener Antibiotika Therapie gering ist. Das nachfolgende Balkendiagramm verbildlicht den Vergleich der durchschnittlichen Sensitivitäten sowie der Positivraten.

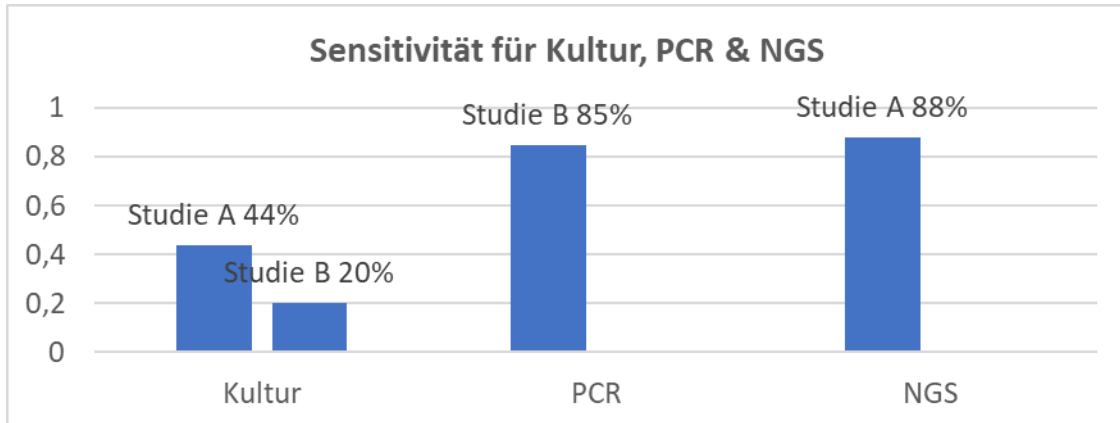


Durchschnittswerte für die Sensitivität der Diagnostikmethoden bei Endophthalmitis in den untersuchten Studien

Während die durchschnittliche Sensitivität von der Kultur Richtung NGS zunimmt, ist die durchschnittliche Positivrate bei PCR kleiner als die der Kultur. Der Grund liegt darin, dass es nur die kleine Anzahl von 4 Positivwerten für die PCR gibt und ein Ausreißer durch die oben erwähnte *Pseudomonas* Diagnostik Studie miteinbezogen wurde. Ohne

diesen Ausreißer wäre die Positivrate der PCR bei 54% und damit zwischen den Werten für die Kultur und NGS.

Zwei Studien vergleichen die Sensitivitätswerte von Kultur, PCR und NGS.



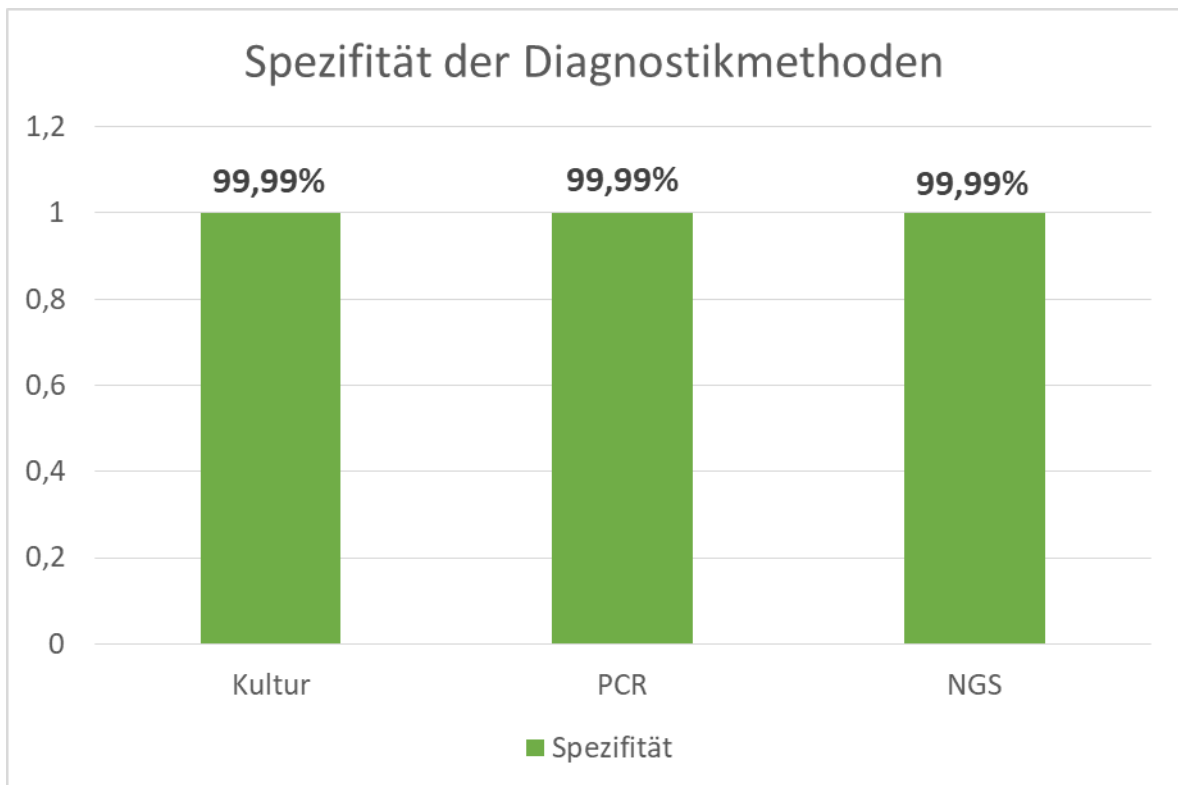
Studie A: Deshmuk et al. (2019)

Studie B: Sandhu et al. (2018)

3.2.4.2 Spezifität

Auf die Spezifität wird in der Literatur nur wenig eingegangen. Wenn sie beschrieben wird, dann mit 100% sowohl bei der Kultur, bei der PCR, als auch bei NGS. Die Kultur wird in zwei Publikationen mit einer Spezifität von je 100% beziffert, bei PCR und NGS liefert jeweils eine Studie auch einen Wert von 100%.

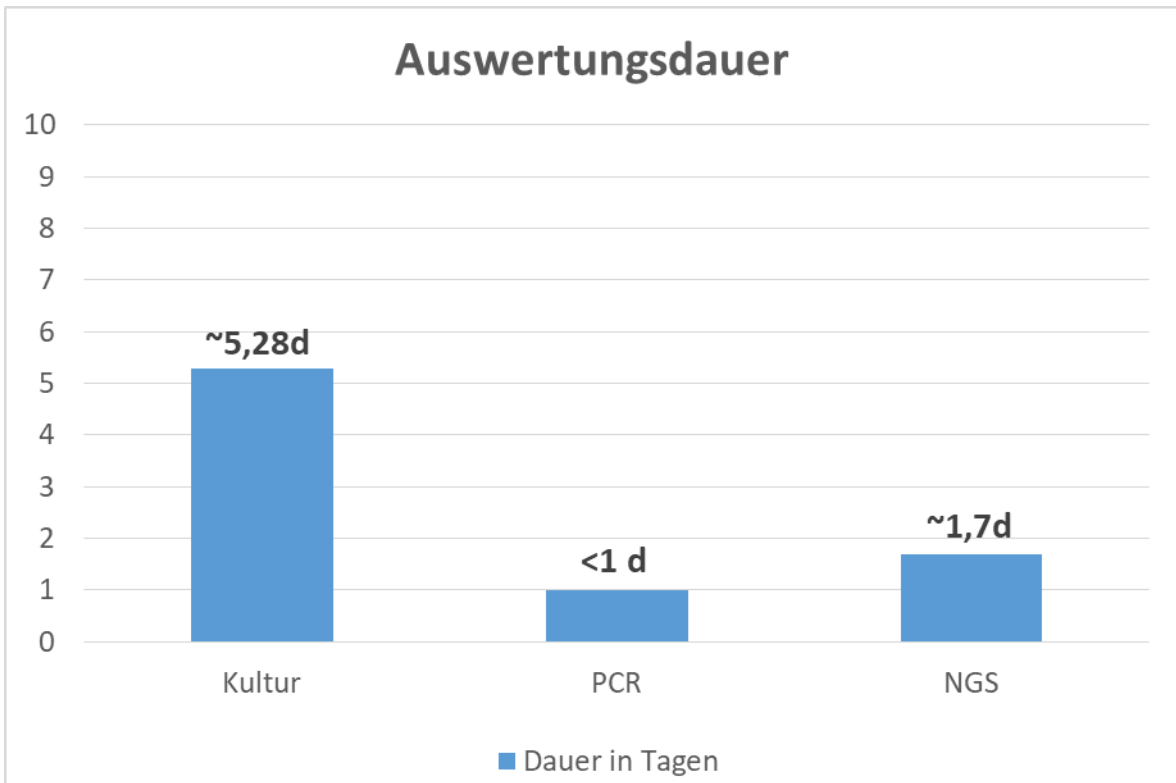
Des Weiteren wird in keiner einzigen Studie von einem falsch positiven Ergebnis von einem Testverfahren berichtet. Es ist daher anzunehmen, dass die Spezifität für alle drei Diagnostikmethoden an 100% grenzt.



Durchschnittswerte für die Spezifität der Diagnostikmethoden bei Endophthalmitis in den untersuchten Studien

3.2.4.3 Dauer

Die längste Zeit benötigt die Kultur mit einer Auswertungsdauer von mehreren Tagen. NGS liefert innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen Ergebnisse, was unter anderem von der Art der Sequenzierung abhängt. Die PCR weist mit wenigen Stunden die kürzeste Zeitspanne bis zum Erhalt des Ergebnisses auf.



Durchschnittswerte für die Auswertungsdauer der Diagnostikmethoden bei Endophthalmitis in den untersuchten Studien

3.2.4.4 Kosten

Die Kosten für die Diagnostikmethoden bei Endophthalmitis unterscheiden sich nicht von denen der Keratitis, eine Kultur oder PCR-Auswertung kostet immer gleich viel und ist eher vom Labor bzw. Standort abhängig.

Folglich ist die Kultur am kostengünstigsten, gefolgt von der PCR und am teuersten ist NGS. Allerdings ist Endophthalmitis ein absoluter ophthalmologischer Notfall, der schnell zu Komplikationen führen kann und damit verbunden intensivierete medizinische Maßnahmen erfordert. Sollte der Erreger durch beispielsweise NGS rasch identifiziert werden, eine adäquate medikamentöse Therapie folglich schnell in die Wege geleitet werden können, ist davon auszugehen, dass die beschriebenen 90 \$ pro Auswertung die anderwärtigen Kosten aufwiegen.

3.2.5 Schlussfolgerungen

Gleich wie bei der Keratitis ist aktuell auch bei der Endophthalmitis nach wie vor die Kultur und teilweise auch die PCR Goldstandard in der Diagnostik. Dies ist auf die Verfügbarkeit und das Preisniveau zurückzuführen und wird sich voraussichtlich auf kurze Sicht nicht ändern.

Allerdings liegt die Ergebnisausbeute deutlich unter der von NGS. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn Kammerwasserproben statt Glaskörperproben ausgewertet werden. Kammerwasserproben sind leichter zu gewinnen, was in der Praxis von Vorteil ist und es könnte auch hier ein Score oder Algorithmus entwickelt werden. Dieser muss neben den bereits angeführten Faktoren wie potenziell geringe Keimzahl, schwer zu kultivierende Erreger, oder Antibiotikagabe vor Probenentnahme auch die Probenart berücksichtigen. In der Literatur wird empfohlen, NGS bei Patient*innen mit klinischem Verdacht und kulturnegativen Proben einzusetzen. (78) Sinnvoller wäre es, bei besagten Fällen direkt mit den sensitiveren Methoden zu beginnen.

Auch bei der Endophthalmitis bleibt es spannend, wie sich das Augenmikrobiom im Falle einer Infektion verändert. Mit NGS wäre eine Sequenzierung und Analyse innerhalb kurzer Zeit möglich.

Bakterien, Pilze und Viren können mit nur einem NGS Assay ausgewertet werden, was sich in einer deutlich kürzeren Auswertungszeit widerspiegelt und weshalb NGS auch der PCR überlegen ist.

Zusätzlich können wieder Kosten eingespart werden, wenn durch NGS-Zusatzuntersuchungen vermieden werden.

Es gilt die technische und preisliche Entwicklung von NGS abzuwarten, womöglich kann es in Zukunft viel umfassender eingesetzt werden.

4 Diskussion

Sowohl bei Endophthalmitis als auch bei Keratitis ist eine rasche Diagnostik erforderlich, um schnellstmöglich eine adäquate Therapie einzuleiten und schwerwiegende Komplikationen, die bis zur Erblindung reichen können, zu vermeiden. In der Diplomarbeit werden die Kultur, die PCR und NGS miteinander verglichen und deren diagnostischer Wert für die beiden Erkrankungen erarbeitet.

Natürlich hat diese Arbeit auch Einschränkungen. Eine systematische Recherche zu dieser Forschungsfrage würde über den Rahmen einer Diplomarbeit hinausgehen und wurde daher auch vom Institut für Medizinische Informatik Graz nicht empfohlen. Passende Filter wurden definiert, die die Arbeit eingrenzen. Außerdem wurde nur auf eine medizinische Datenbank, nämlich pubmed, zurückgegriffen.

Weiter limitierend ist, dass man nicht mit Sicherheit davon ausgehen kann, dass die behandelten Publikationen frei von Fehlern sind. Zusätzlich unterscheiden sie sich in ihren Methodiken voneinander. Es wurden unterschiedliche Referenzstandards verwendet, die Patient*innen waren teilweise vor der Probenentnahme prätherapiert, die Kulturen wurden unterschiedlich lang gezüchtet und die Probenanzahl der verschiedenen Studien divergiert stark.

Obwohl die Bewertung der Diagnostikmethoden von klinischer Relevanz ist, finden sich nur sehr wenige Studien, die konkrete Werte für die Sensitivität, Spezifität, Durchlaufzeit, oder Kosten liefern.

Nichtsdestotrotz ist ein Vergleich der Diagnostikmethoden gelungen, der zwar nicht absolute Zahlen für die untersuchten Werte liefern kann, aber doch einen klaren Trend aufzeigt und den Diagnostikmethoden eine Wertigkeit zuschreibt. Für exakte Angaben zu den Sensitivitäten etc. wäre es erforderlich, weiterführende Studien mit einheitlich definierten Referenzstandards, sowie einer größtmöglichen Probenanzahl durchzuführen.

Als Resultat aus dieser Literaturrecherche ist ein ganz klarer Trend bezüglich der Sensitivität zu Gunsten von Next Generation Sequencing Methoden zu erkennen, worauf die PCR folgt und die Kultur weit davon entfernt ist. Auch die Auswertungsdauer ist bei

der Kultur im Vergleich zu NGS oder PCR mit mehreren Tagen deutlich länger. Bezüglich der Sensitivität ist der Unterschied zwischen PCR und NGS geringer, wobei NGS mittels nur einem Assay Bakterien, Pilze und Viren auswerten kann und damit hinsichtlich der Auswertungsdauer der PCR überlegen ist. Außerdem bietet NGS die Möglichkeit, das gesamte Augenmikrobiom innerhalb kürzester Zeit zu sequenzieren, dessen Veränderung voraussichtlich von hohem diagnostischem Nutzen, nicht nur bei infektiösen Erkrankungen, ist.

Die Kultur ist bezüglich Verfügbarkeit und Kosten unschlagbar, die PCR ist zwar auch gut verfügbar, aber etwas teurer, eine NGS Analyse ist am kostspieligsten. Andererseits könnte der Umstand, dass weiterführende Untersuchungen und Komplikationen vermieden werden können, die einmaligen und anfänglichen Mehrkosten rechtfertigen.

Diese Trends treten in allen Studien deutlich hervor. Es gibt keine Studie, in der die Auswertungszeit zur Erregerdiagnostik bei NGS länger ist, oder die Sensitivität geringer ist als bei der Kultur.

Vergleicht man die Resultate mit anderen Studien, so wird bestätigt, dass die Werte für die Sensitivität stark divergieren, NGS gefolgt von PCR aber immer noch die höchsten Zahlen dafür aufweist. Die Spezifität hingegen ist in fast allen Studien für alle untersuchten Diagnostikmethoden zwischen 90% und 100%.

Gopinathan et al. erzielt für die Sensitivität der Kultur bei bakterieller Keratitis 56,6%, 89,8% bei der Pilzkeratitis und 73,3% für die Akanthamoebenkeratitis. Die Spezifität wird mit Werten von 93,7%-99,8% angegeben. Für die Studie wurden 5897 Hornhautabstriche ausgewertet. (93)

Eleinen et al. erreicht eine Sensitivität für die Kultur bei der bakteriellen Keratitis von 57,58%, für die Pilzkeratitis 59,09%. (94)

Die Sensitivität der Akanthamoeben Kultur variiert häufig zwischen 30% und 70%.

Boggild et al. berichtet von einer Sensitivität von 55% (95), ähnlich hoch liegt sie bei Tu et al. mit 52%. (96) Eine weitere Studie mit einer großen Anzahl an Proband*innen berichtet von einer sehr niedrigen Sensitivität von 7%. (97)

Die PCR zur Akanthamoeben Diagnostik bewegt sich ebenfalls in anderen Studien in einem Sensitivitätsbereich von zirka 77% (98) bis über 88%, (99) was auch den Werten in den behandelten Studien entspricht. Yera et al. berichtet von kombinierten PCR Assays die eine Sensitivität von 94% erreichen. (97)

Auch bei der bakteriellen und fungalen Keratitis erreicht die PCR deutlich höhere Werte

als die Kultur in Vergleichsstudien. Eleinen et al. beschreibt eine Sensitivität von 87,88% für die bakterielle und 90,91% für die Pilzkeratitis. (94) Ebenso berichtet Zhao et al. von einer Sensitivität von 98% bei Verwendung von PCR zur Diagnostik von Pilzkeratitis. (100) An et al. vergleicht die Illumina Sequenzierung mit der Kultur, während die Kultivierung nur eine Positivrate von 69,4% der Proben liefert, beträgt die Positivrate von NGS 100%. Die Diagnosestellung bei den Studienteilnehmer*innen ist durch klinische Zeichen einer infektiösen Keratitis, oder durch positive konfokale in-vivo-Mikroskopie oder mikroskopischer Untersuchung von Hornhautabstrichen erfolgt. (101)

Die Zahlen für die Sensitivität der Kultur bei der Endophthalmitis variieren ebenfalls. Ein Faktor ist der unterschiedliche Entnahmeort der Proben. Die meisten Entnahmen entstammen dem Glaskörper, manche der Vorderkammer. Glaskörperproben gelten als Goldstandard und haben eine höhere Sensitivität als die Vorderkammerproben. Sjöholm-Gomez de Liano et al. untersucht die Sensitivität von Vorderkammerpunktionen bei bakterieller Endophthalmitis. Je nach Genese der Endophthalmitis, sei es traumatisch oder postoperativ, gibt es eine unterschiedliche Sensitivität für die Kultur, die sich zwischen 20% und 62,5% bewegt. Die Gesamtsensitivität wird mit nur 38,21%, die Gesamtspezifität mit nur 75,51% beziffert. (102) AlBloushi et al. erreicht einen Sensitivitätswert von 51,43%, sowie eine Spezifität von 92,52% für Kulturen beimpft mit Kammerwasserproben bei ebenfalls bakterieller Endophthalmitis. Trotz der vergleichsweise höheren Sensitivität schnitten Glaskörperproben in der Studie bezüglich der Ausbeute besser ab. (103) Die Positivraten von Glaskörperproben in früheren Studien befinden sich in einem ähnlichen Bereich wie die Positivraten in den untersuchten Studien. Diese liegen zwischen 32,3% (103) und 64,7%. (102) Barza et al. beschreibt bei einer großen Stichprobe von 420 Teilnehmer*innen eine Positivrate von 54,9% für Glaskörper- und 22,5% für Kammerwasserproben bei postoperativer Endophthalmitis. (104)

In der behandelten Literatur erzielt die PCR weit höhere Sensitivitätswerte als die Kultur. Auch ältere Studien schreiben der PCR dahingehend eine Überlegenheit zu, bei Sowmya et al. wird eine Sensitivität bei 72 Proben von 100% erreicht, während die Kultur nur in 37,5% der Proben Erreger nachweist. Allerdings gibt es in dieser Studie keine negative Kontrollgruppe. (105) Okhravi et al. beschreibt eine ebenfalls 100%ige Erkennungsrate der PCR bei 37 Glaskörper- und Kammerwasserproben bei Patient*innen mit klinisch bakterieller Endophthalmitis. Die Kultur weist den Erreger bei selbigen Proben nur in 33,3% im Kammerwasser und in ca. 68% im Glaskörper nach. In dieser Studie wird auch

eine Kontrollgruppe von 38 Proben angeführt, bei der die PCR aufgrund von Kontamination in 5% falsch positive Ergebnisse liefert. (106) Chiquet et al. vergleicht PCR und Kultur bei Patient*innen mit klinischer Endophthalmitis, die bereits antibiotisch behandelt werden. Hier identifiziert die PCR in 61% der Proben den Erreger, während die Kultur dies in 32% schafft. (107)

Zhu et al. vergleicht NGS mit der Kultur anhand von 36 Glaskörper- oder Kammerwasserproben bei Patient*innen mit klinisch diagnostizierter Endophthalmitis. NGS erreicht eine Positivrate von 88,89%, während die Kultur nur 27,78% erreicht. (108)

Li et al. berichtet von einer ähnlichen Positivrate für die Nanopore Sequenzierung von 86,05% im Vergleich zur Kultur mit 20,93%. (109)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die große Mehrheit der Vergleichsstudien die beschriebenen Trends in der Wertigkeit der Diagnostikmethoden bestätigen.

In der Behandlung von Patient*innen wäre es von Vorteil, wenn es klare Richtlinien bezüglich der Auswahl der entsprechenden Diagnostikmethode geben würde, um die Ausbeute an Resultaten zu erhöhen. Diese Richtlinien könnten in zukünftigen Projekten erarbeitet werden.

Ebenso bleibt offen, wie sich NGS-Methoden technisch und preislich entwickeln werden, sowie die anstehenden Forschungen zur Sequenzierung ganzer Augenmikrobiome und deren Veränderungen bei Erkrankungen.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde ein Poster auf der IUSG in Utrecht veröffentlicht, das die behandelten Studien kompakt gegenüberstellt und die beschriebenen Trends bezüglich der untersuchten Parameter graphisch darstellt. (110)

Literaturverzeichnis

1. Grehn F. Augenheilkunde. 32. Auflage ed. Würzburg, Deutschland: Springer; 2019.
2. Bowling B. KANSKIs Klinische Ophthalmologie 8. Auflage ed. München, Deutschland: Elsevier; 2016.
3. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001;79(3):214-21.
4. Ong HS, Corbett MC. Corneal infections in the 21st century. *Postgrad Med J.* 2015;91(1080):565-71.
5. Shah A, Sachdev A, Coggon D, Hossain P. Geographic variations in microbial keratitis: an analysis of the peer-reviewed literature. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(6):762-7.
6. Schmack I, Müller M, Kohnen T. [Microbial keratitis: Understand, recognize, and treat - part 1: General aspects and characteristics of bacterial keratitis]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2018;235(3):331-50.
7. Thomas PA, Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(3):210-20.
8. Pleyer U, Behrens-Baumann W. [Bacterial keratitis. Current diagnostic aspects]. *Ophthalmologe.* 2007;104(1):9-14.
9. Song KP, Chan TK, Ji ZL, Wong SW. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* from ocular isolates by PCR using exotoxin A-specific primers. *Mol Cell Probes.* 2000;14(4):199-204.
10. McDonald EM, Ram FS, Patel DV, McGhee CN. Topical antibiotics for the management of bacterial keratitis: an evidence-based review of high quality randomised controlled trials. *Br J Ophthalmol.* 2014;98(11):1470-7.
11. Orlans HO, Hornby SJ, Bowler IC. In vitro antibiotic susceptibility patterns of bacterial keratitis isolates in Oxford, UK: a 10-year review. *Eye (Lond).* 2011;25(4):489-93.
12. Herretes S, Wang X, Reyes JM. Topical corticosteroids as adjunctive therapy for bacterial keratitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;10(10):Cd005430.
13. Ghosh AK, Gupta A, Rudramurthy SM, Paul S, Hallur VK, Chakrabarti A. Fungal Keratitis in North India: Spectrum of Agents, Risk Factors and Treatment. *Mycopathologia.* 2016;181(11-12):843-50.
14. Mahmoudi S, Masoomi A, Ahmadikia K, Tabatabaei SA, Soleimani M, Rezaie S, et al. Fungal keratitis: An overview of clinical and laboratory aspects. *Mycoses.* 2018;61(12):916-30.
15. Thomas PA, Leck AK, Myatt M. Characteristic clinical features as an aid to the diagnosis of suppurative keratitis caused by filamentous fungi. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(12):1554-8.
16. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Vasu S, Meenakshi R, Palaniappan R. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. *Indian J Ophthalmol.* 2003;51(4):315-21.
17. Wu J, Zhang WS, Zhao J, Zhou HY. Review of clinical and basic approaches of fungal keratitis. *Int J Ophthalmol.* 2016;9(11):1676-83.
18. Ferrer C, Alió JL. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. Ten years of experience. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2011;1(1):15-22.

19. Rakeman JL, Bui U, Lafe K, Chen YC, Honeycutt RJ, Cookson BT. Multilocus DNA sequence comparisons rapidly identify pathogenic molds. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3324-33.
20. Srinivasan M. Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol.* 2004;15(4):321-7.
21. Rowe AM, St Leger AJ, Jeon S, Dhaliwal DK, Knickelbein JE, Hendricks RL. Herpes keratitis. *Prog Retin Eye Res.* 2013;32:88-101.
22. Liesegang TJ, Melton LJ, 3rd, Daly PJ, Ilstrup DM. Epidemiology of ocular herpes simplex. Incidence in Rochester, Minn, 1950 through 1982. *Arch Ophthalmol.* 1989;107(8):1155-9.
23. Harris KD. Herpes Simplex Virus Keratitis. *Home Healthc Now.* 2019;37(5):281-4.
24. Yawn BP, Wollan PC, St Sauver JL, Butterfield LC. Herpes zoster eye complications: rates and trends. *Mayo Clin Proc.* 2013;88(6):562-70.
25. Marsh RJ, Cooper M. Oral acyclovir in acute herpes zoster. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1987;294(6573):704.
26. Johnson JL, Amzat R, Martin N. Herpes Zoster Ophthalmicus. *Prim Care.* 2015;42(3):285-303.
27. Chigbu DI, Labib BA. Pathogenesis and management of adenoviral keratoconjunctivitis. *Infect Drug Resist.* 2018;11:981-93.
28. Martin C, Löw U, Quintin A, Schießl G, Gärtner B, Heim A, et al. Epidemic keratoconjunctivitis: efficacy of outbreak management. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2022;260(1):173-80.
29. Ibrahim YW, Boase DL, Cree IA. Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmic Epidemiol.* 2007;14(2):53-60.
30. Maycock NJ, Jayaswal R. Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Cornea.* 2016;35(5):713-20.
31. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite.* 2015;22:10.
32. Sheu SJ. Endophthalmitis. *Korean J Ophthalmol.* 2017;31(4):283-9.
33. Ramakrishnan R, Bharathi MJ, Shivkumar C, Mittal S, Meenakshi R, Khadeer MA, et al. Microbiological profile of culture-proven cases of exogenous and endogenous endophthalmitis: a 10-year retrospective study. *Eye (Lond).* 2009;23(4):945-56.
34. Durand ML. Endophthalmitis. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(3):227-34.
35. Sheu SJ, Kung YH, Wu TT, Chang FP, Horng YH. Risk factors for endogenous endophthalmitis secondary to *klebsiella pneumoniae* liver abscess: 20-year experience in Southern Taiwan. *Retina.* 2011;31(10):2026-31.
36. Durand ML. Bacterial and Fungal Endophthalmitis. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(3):597-613.
37. Yoon YH, Lee SU, Sohn JH, Lee SE. Result of early vitrectomy for endogenous *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. *Retina.* 2003;23(3):366-70.
38. Jackson TL, Paraskevopoulos T, Georgalas I. Systematic review of 342 cases of endogenous bacterial endophthalmitis. *Surv Ophthalmol.* 2014;59(6):627-35.
39. Simakurthy S, Tripathy K. Endophthalmitis. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*
Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
40. Vaziri K, Schwartz SG, Kishor K, Flynn HW, Jr. Endophthalmitis: state of the art. *Clin Ophthalmol.* 2015;9:95-108.

41. Xu K, Chin EK, Bennett SR, Williams DF, Ryan EH, Dev S, et al. Endophthalmitis after Intravitreal Injection of Vascular Endothelial Growth Factor Inhibitors: Management and Visual Outcomes. *Ophthalmology*. 2018;125(8):1279-86.
42. Thompson WS, Rubsamen PE, Flynn HW, Jr., Schiffman J, Cousins SW. Endophthalmitis after penetrating trauma. Risk factors and visual acuity outcomes. *Ophthalmology*. 1995;102(11):1696-701.
43. Scott IU, Flynn HW, Jr., Dev S, Shaikh S, Mittra RA, Arevalo JF, et al. Endophthalmitis after 25-gauge and 20-gauge pars plana vitrectomy: incidence and outcomes. *Retina*. 2008;28(1):138-42.
44. Shirodkar AR, Pathengay A, Flynn HW, Jr., Albin TA, Berrocal AM, Davis JL, et al. Delayed- versus acute-onset endophthalmitis after cataract surgery. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(3):391-8.e2.
45. Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Flynn HW, Jr., Schwartz SG, Davis JL, Murray TG, et al. Endophthalmitis after intravitreal vascular [corrected] endothelial growth factor antagonists: a six-year experience at a university referral center. *Retina*. 2011;31(4):662-8.
46. Chaudhry IA, Shamsi FA, Al-Harhi E, Al-Theeb A, Elzaridi E, Riley FC. Incidence and visual outcome of endophthalmitis associated with intraocular foreign bodies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(2):181-6.
47. Lalwani GA, Flynn HW, Jr., Scott IU, Quinn CM, Berrocal AM, Davis JL, et al. Acute-onset endophthalmitis after clear corneal cataract surgery (1996-2005). Clinical features, causative organisms, and visual acuity outcomes. *Ophthalmology*. 2008;115(3):473-6.
48. Fileta JB, Scott IU, Flynn HW, Jr. Meta-analysis of infectious endophthalmitis after intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor agents. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2014;45(2):143-9.
49. Roth DB, Flynn HW, Jr. Distinguishing between infectious and noninfectious endophthalmitis after intravitreal triamcinolone injection. *Am J Ophthalmol*. 2008;146(3):346-7.
50. Nicoară SD, Irimescu I, Călinici T, Cristian C. Outcome and Prognostic Factors for Traumatic Endophthalmitis over a 5-Year Period. *J Ophthalmol*. 2014;2014:747015.
51. Weems JJ, Jr. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*. 1992;14(3):756-66.
52. Wykoff CC, Flynn HW, Jr., Miller D, Scott IU, Alfonso EC. Exogenous fungal endophthalmitis: microbiology and clinical outcomes. *Ophthalmology*. 2008;115(9):1501-7, 7.e1-2.
53. Helmut Hahn DF, Paul Klein. *Medizinische Mikrobiologie*. GmbH S-VBH, editor. Berlin Heidelberg 1991.
54. Bast DE. *Mikrobiologische Methoden - eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. Heidelberg · Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2001.
55. Canene-Adams K. General PCR. *Methods Enzymol*. 2013;529:291-8.
56. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020;69(4):317-25.
57. Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 10:10.4.1-4.8.
58. Dymond JS. Explanatory chapter: quantitative PCR. *Methods Enzymol*. 2013;529:279-89.

59. Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol.* 2013;530:67-74.
60. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019(2).
61. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-8.
62. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol.* 2021;82(11):801-11.
63. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):e59.
64. Goh JWY, Harrison R, Hau S, Alexander CL, Tole DM, Avadhanam VS. Comparison of In Vivo Confocal Microscopy, PCR and Culture of Corneal Scrapes in the Diagnosis of Acanthamoeba Keratitis. *Cornea.* 2018;37(4):480-5.
65. Yera H, Ok V, Lee Koy Kuet F, Dahane N, Ariey F, Haseine L, et al. PCR and culture for diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *Br J Ophthalmol.* 2021;105(9):1302-6.
66. Megha K, Sharma M, Gupta A, Sehgal R, Khurana S. Microbiological diagnosis of Acanthamoebic keratitis: experience from tertiary care center of North India. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021;100(2):115339.
67. Behera HS, Srigyan D. Evaluation of Polymerase Chain Reaction over Routine Microbial Diagnosis for the Diagnosis of Fungal Keratitis. *Optom Vis Sci.* 2021;98(3):280-4.
68. Ung L, Bispo PJM, Doan T, Van Gelder RN, Gilmore MS, Lietman T, et al. Clinical metagenomics for infectious corneal ulcers: Rags to riches? *Ocul Surf.* 2020;18(1):1-12.
69. Ren Z, Liu Q, Wang Y, Dong Y, Huang Y. Diagnostic information Profiling and Evaluation of Causative Fungi of Fungal Keratitis Using High-throughput Internal Transcribed Spacer Sequencing. *Sci Rep.* 2020;10(1):1640.
70. Lalitha P, Prajna NV, Sikha M, Gunasekaran R, Hinterwirth A, Worden L, et al. Evaluation of Metagenomic Deep Sequencing as a Diagnostic Test for Infectious Keratitis. *Ophthalmology.* 2021;128(3):473-5.
71. Ma L, Jakobiec FA, Dryja TP. A Review of Next-Generation Sequencing (NGS): Applications to the Diagnosis of Ocular Infectious Diseases. *Semin Ophthalmol.* 2019;34(4):223-31.
72. Ung L, Bispo PJM, Shanbhag SS, Gilmore MS, Chodosh J. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. *Surv Ophthalmol.* 2019;64(3):255-71.
73. Manikandan P, Abdel-Hadi A, Randhir Babu Singh Y, Revathi R, Anita R, Banawas S, et al. Fungal Keratitis: Epidemiology, Rapid Detection, and Antifungal Susceptibilities of Fusarium and Aspergillus Isolates from Corneal Scrapings. *Biomed Res Int.* 2019;2019:6395840.
74. Ren Z, Liu Q, Li W, Wu X, Dong Y, Huang Y. Profiling of Diagnostic Information of and Latent Susceptibility to Bacterial Keratitis From the Perspective of Ocular Bacterial Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:645907.
75. Holmgaard DB, Barnadas C, Mirbarati SH, O'Brien Andersen L, Nielsen HV, Stensvold CR. Detection and Identification of Acanthamoeba and Other Nonviral Causes of Infectious Keratitis in Corneal Scrapings by Real-Time PCR and Next-Generation Sequencing-Based 16S-18S Gene Analysis. *J Clin Microbiol.* 2021;59(2).

76. Eguchi H, Hotta F, Kuwahara T, Imaohji H, Miyazaki C, Hirose M, et al. Diagnostic Approach to Ocular Infections Using Various Techniques From Conventional Culture to Next-Generation Sequencing Analysis. *Cornea*. 2017;36 Suppl 1:S46-s52.
77. Austin A, Lietman T, Rose-Nussbaumer J. Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*. 2017;124(11):1678-89.
78. Deshmukh D, Joseph J, Chakrabarti M, Sharma S, Jayasudha R, Sama KC, et al. New insights into culture negative endophthalmitis by unbiased next generation sequencing. *Sci Rep*. 2019;9(1):844.
79. Sandhu HS, Hajrasouliha A, Kaplan HJ, Wang W. Diagnostic Utility of Quantitative Polymerase Chain Reaction versus Culture in Endophthalmitis and Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2019;27(4):578-82.
80. Dong K, Kang Z, Ji X, Zhang X, Cheng P, Sun B. A Loop-mediated Isothermal Amplification With a Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor Assay to Detect *Pseudomonas aeruginosa* in Endophthalmitis. *Transl Vis Sci Technol*. 2021;10(14):26.
81. Jun KI, Oh BL, Kim N, Shin JY, Moon J. Microbial diagnosis of endophthalmitis using nanopore amplicon sequencing. *Int J Med Microbiol*. 2021;311(4):151505.
82. Mitra S, Agarwal T, Naik A, Padhi TR, Basu S, Behera UC. Post-Traumatic Endophthalmitis: Clinico-Microbiological Profile, Antimicrobial Susceptibility and Prognostic Factors at a Tertiary Eye Care Centre in Eastern India. *Semin Ophthalmol*. 2021;36(8):742-50.
83. Feng HL, Robbins CB, Fekrat S. A Nine-Year Analysis of Practice Patterns, Microbiologic Yield, and Clinical Outcomes in Cases of Presumed Infectious Endophthalmitis. *Ophthalmol Retina*. 2020;4(6):555-9.
84. Mishra D, Satpathy G, Chawla R, Venkatesh P, Ahmed NH, Panda SK. Utility of broad-range 16S rRNA PCR assay versus conventional methods for laboratory diagnosis of bacterial endophthalmitis in a tertiary care hospital. *Br J Ophthalmol*. 2019;103(1):152-6.
85. Naik P, Singh S, Dave VP, Ali MH, Kumar A, Joseph J. Vitreous D-Lactate Levels as a Biomarker in the Diagnosis of Presumed Infectious Culture Negative Endophthalmitis. *Curr Eye Res*. 2020;45(2):184-9.
86. Teng YT, Teng MC, Kuo HK, Fang PC, Wu PC, Chen CH, et al. Isolates and antibiotic susceptibilities of endophthalmitis in postcataract surgery: a 12-year review of culture-proven cases. *Int Ophthalmol*. 2017;37(3):513-8.
87. Kosacki J, Boisset S, Maurin M, Cornut PL, Thuret G, Hubanova R, et al. Specific PCR and Quantitative Real-Time PCR in Ocular Samples from Acute and Delayed-Onset Postoperative Endophthalmitis. *Am J Ophthalmol*. 2020;212:34-42.
88. Selva Pandiyan A, Siva Ganesa Karthikeyan R, Rameshkumar G, Sen S, Lalitha P. Identification of Bacterial and Fungal Pathogens by rDNA Gene Barcoding in Vitreous Fluids of Endophthalmitis Patients. *Semin Ophthalmol*. 2020;35(7-8):358-64.
89. Huang Q, Fu A, Wang Y, Zhang J, Zhao W, Cheng Y. Microbiological diagnosis of endophthalmitis using nanopore targeted sequencing. *Clin Exp Ophthalmol*. 2021;49(9):1060-8.
90. Kehrmann J, Chapot V, Buer J, Rating P, Bornfeld N, Steinmann J. Diagnostic performance of blood culture bottles for vitreous culture compared to conventional microbiological cultures in patients with suspected endophthalmitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(5):889-95.

91. Xu S, Zhou C, Zhang P, Feng C, Zhang T, Sun Z, et al. Diagnostic Performance of MALDI-TOF MS Compared to Conventional Microbiological Cultures in Patients with Suspected Endophthalmitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2020;28(3):483-90.
92. Tanaka T, Ferreira BFA, Oliveira LMS, Kato JM, Gioia T, Rossi F, et al. Diagnostic value of pediatric blood culture bottles for acute postoperative endophthalmitis. *Clinics (Sao Paulo).* 2019;74:e837.
93. Gopinathan U, Sharma S, Garg P, Rao GN. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. *Indian J Ophthalmol.* 2009;57(4):273-9.
94. Eleinen KG, Mohalhal AA, Elmekawy HE, Abdulbaki AM, Sherif AM, El-Sherif RH, et al. Polymerase chain reaction-guided diagnosis of infective keratitis - a hospital-based study. *Curr Eye Res.* 2012;37(11):1005-11.
95. Boggild AK, Martin DS, Lee TY, Yu B, Low DE. Laboratory diagnosis of amoebic keratitis: comparison of four diagnostic methods for different types of clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1314-8.
96. Tu EY, Joslin CE, Sugar J, Booton GC, Shoff ME, Fuerst PA. The relative value of confocal microscopy and superficial corneal scrapings in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 2008;27(7):764-72.
97. Yera H, Zamfir O, Bourcier T, Ancelle T, Batellier L, Dupouy-Camet J, et al. Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(3):221-4.
98. Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, Wilson ME, Allen RC, Folberg R. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol.* 2000;118(2):178-83.
99. Pasricha G, Sharma S, Garg P, Aggarwal RK. Use of 18S rRNA gene-based PCR assay for diagnosis of *acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3206-11.
100. Zhao G, Zhai H, Yuan Q, Sun S, Liu T, Xie L. Rapid and sensitive diagnosis of fungal keratitis with direct PCR without template DNA extraction. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):O776-82.
101. An N, Wang C, Dou X, Liu X, Wu J, Cheng Y. Comparison of 16S rDNA Amplicon Sequencing With the Culture Method for Diagnosing Causative Pathogens in Bacterial Corneal Infections. *Transl Vis Sci Technol.* 2022;11(2):29.
102. Sjöholm-Gomez de Liano C, Soberon-Ventura VF, Salcedo-Villanueva G, Santos-Palacios A, Guerrero-Naranjo JL, Fromow-Guerra J, et al. Sensitivity, specificity and predictive values of anterior chamber tap in cases of bacterial endophthalmitis. *Eye Vis (Lond).* 2017;4:18.
103. AlBloushi AF, Ajamil-Rodanes S, Testi I, Wagland C, Grant-McKenzie N, Pavesio C. Diagnostic value of culture results from aqueous tap versus vitreous tap in cases of bacterial endophthalmitis. *Br J Ophthalmol.* 2022;106(6):815-9.
104. Barza M, Pavan PR, Doft BH, Wisniewski SR, Wilson LA, Han DP, et al. Evaluation of microbiological diagnostic techniques in postoperative endophthalmitis in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. *Arch Ophthalmol.* 1997;115(9):1142-50.
105. Sowmya P, Madhavan HN. Diagnostic utility of polymerase chain reaction on intraocular specimens to establish the etiology of infectious endophthalmitis. *Eur J Ophthalmol.* 2009;19(5):812-7.

106. Okhravi N, Adamson P, Carroll N, Dunlop A, Matheson MM, Towler HM, et al. PCR-based evidence of bacterial involvement in eyes with suspected intraocular infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(11):3474-9.
107. Chiquet C, Lina G, Benito Y, Cornut PL, Etienne J, Romanet JP, et al. Polymerase chain reaction identification in aqueous humor of patients with postoperative endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(4):635-41.
108. Zhu J, Xia H, Tang R, Ng TK, Yao F, Liao X, et al. METAGENOMIC NEXT-GENERATION SEQUENCING DETECTS PATHOGENS IN ENDOPHTHALMITIS PATIENTS. *Retina.* 2022;42(5):992-1000.
109. Li X, Li Z, Wang M, Fu A, Hao X, Guo X, et al. The diagnostic utility of nanopore targeted sequencing in suspected endophthalmitis. *Int Ophthalmol.* 2023.
110. Mairitsch M. Methods of pathogen diagnostics in ophthalmology - from culture, to PCR, to next generation sequencing. Graz, Austria 2022.