

Aus der Klinik für Augenheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Walter Sekundo
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**Bestimmung der Standortflora der Augenoberfläche an
einem Marburger Kollektiv**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Felix Schröder aus Berlin
Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
17.06.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Walter Sekundo

1. Korreferent: Prof. Dr. Frank Günther

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Abbildungsverzeichnis	4
3	Tabellenverzeichnis	5
4	Einleitung	6
4.1	Anatomie & Physiologie	6
4.1.1	Konjunktiva	6
4.1.2	Cornea	7
4.1.3	Tränenfilm	8
4.1.4	Zusammenfassung	8
4.2	Infektionen der Augenoberfläche - eine epidemiologische Einordnung	9
4.3	Diagnostik bei bakterieller Konjunktivitis und Keratitis	9
4.4	Gegenstand bisheriger Forschung	10
4.4.1	Normalflora	10
4.4.2	Erregerspektrum bei Keratitis und Konjunktivitis	12
4.4.3	Zusammenfassung und Problematik	12
5	Material und Methoden	14
5.1	Studienpopulation	14
5.2	Studiendesign	14
5.3	Probengewinnung	14
5.4	Mikrobiologische Analysen	16
5.4.1	Exkurs: Keimbestimmung per Massenspektrometrie	18
5.5	Endpunkte der Studie	19
5.6	Statistische Analysen	19
5.7	Material und Geräte	23
6	Ergebnisse	24
6.1	Demographie	24
6.2	Keimnachweisrate	26
6.3	Keimnachweisrate unter Berücksichtigung der Vorbehandlung	27
6.4	Nachweisrate nach Gram-Verhalten und Erscheinungsbild	29

5.5 Nachweisrate innerhalb spezieller Klassen	32
6.6 Keimmenge	37
7 Diskussion	41
7.1 Keimnachweisrate	41
7.2 Keimdifferenzierung	42
7.3 Keimmenge	45
7.4 Bedeutung für den klinischen Alltag	46
7.4.1 Exkurs: klinische Befunde zur Evaluation von Erregern	47
7.5 Zusammenfassung & Ausblick	48
8 Zusammenfassung	49
9 Summary	52
10 Literaturverzeichnis	54
11 Anhang	60
11.1 Verzeichnis der akademischen Lehrenden	60
11.2 Danksagung	62

1 Abkürzungsverzeichnis

BHI	Brain Heart Infusion
BVA	Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V.
CALT	Conjunctiva associated lymphatic tissue
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft
IgA	Immunglobuline der Klasse A
KI	Konfidenzintervall
MALDI	matrix associated laser desorption/ionisation
MS	Massenspektrometrie
OR	Odds Ratio
PR	Polymerase Chain Reaction
Sp	Species
TOF	Time of Flight
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
WHO	World Health Organization

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abstrich in der Fornix conjunctivae inferior _____	15
Abbildung 2: Abstrich über der peripheren Cornea _____	15
Abbildung 3: Schaubild zum Ablauf der Abstriche für die Gruppe der Augengesunden _____	16
Abbildung 4: Schaubild zum Ablauf der mikrobiologischen Analysen _____	18
Abbildung 5: Verteilung von Alter und Geschlecht der Personen zum Zeitpunkt der Bindehautabstriche _____	25
Abbildung 6: Verteilung von Alter und Geschlecht der Personen zum Zeitpunkt der Hornhautabstriche _____	26
Abbildung 7: Keimnachweisraten bei Bindehautabstrichen _____	27
Abbildung 8: Keimnachweisraten bei Hornhautabstrichen _____	27
Abbildung 9: Keimnachweisraten bei Bindehautabstrichen unter Ausschluss der Vorbehandelten	29
Abbildung 10: Keimnachweisraten bei Hornhautabstrichen unter Ausschluss der Vorbehandelten	29
Abbildung 11: Keimnachweisraten der Keimgruppen bei Bindehautabstrichen _____	31
Abbildung 12: Keimnachweisraten der Keimgruppen bei Hornhautabstrichen _____	32
Abbildung 13: Keimnachweisraten der einzelnen Keime bzw. Keimklassen bei Bindehautabstrichen _____	34
Abbildung 14: Keimnachweisraten der einzelnen Keime bzw. Keimklassen bei Hornhautabstrichen _____	34
Abbildung 15: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung aller Keime _____	37
Abbildung 16: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung Koagulase-negativer Staphylokokken _____	38
Abbildung 17: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung von Staphylococcus aureus _	38
Abbildung 18: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung der Streptokokken _____	39
Abbildung 19: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung der Coryne- und Propionibakterien _____	39

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorlage einer Vierfeldertafel _____	21
Tabelle 2: Auszug aus dem zugrunde liegenden Datensatz _____	22
Tabelle 3: Material _____	23
Tabelle 4: Geräte _____	23
Tabelle 5: Zusammensetzung der Studienpopulation _____	25
Tabelle 6: Ergebnisse der Gegenüberstellung der Keimnachweisrate bei Augengesunden und Patient:innen mit vermuteter Infektion im exakten χ^2 -Test nach Fisher _____	26
Tabelle 7: Ergebnisse der Gegenüberstellung der Keimnachweisrate bei Augengesunden und Patient:innen mit vermuteter Infektion unter Ausschluss der Vorbehandelten im exakten χ^2 -Test nach Fisher _____	28
Tabelle 8: Ergebnisse der Gegenüberstellung der Nachweisrate nach Gram-Verhalten bei Augengesunden und Patient:innen mit vermuteter Infektion im exakten χ^2 -Test nach Fisher _____	31
Tabelle 9: Ergebnisse der Gegenüberstellung der Nachweisrate der einzelnen Keime bzw. Keimklassen bei Augengesunden und Patient:innen mit vermuteter Infektion im exakten χ^2 -Test nach Fisher _____	33
Tabelle 10: Prävalenz der durch Bindehautabstriche nachgewiesenen Keime _____	35
Tabelle 11: Nachweisraten der einzelnen Keime bei Hornhautabstrichen _____	36
Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der Keimmenge, sowie die Ergebnisse des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests _____	40

4 Einleitung

Die folgende Arbeit soll einen Baustein zur besseren Interpretation mikrobiologischer Befunde in der Augenheilkunde liefern. Es ist oft schwierig mikrobiologische Ergebnisse richtig einzuordnen und wirkungsvolle therapeutische Entscheidungen zu treffen. Im Folgenden nur einige Faktoren, die zu einer Fehleinschätzung des Befundes beitragen können:

Die Augenoberfläche ist kein steriler Ort (65). Es existiert eine Normalflora, die bei einer mikrobiologischen Untersuchung mitkultiviert wird, sodass Testverfahren intrinsisch eine geringere Spezifität zeigen und es oftmals schwierig ist die Pathogenität eines nachgewiesenen Keims richtig einzuschätzen. Außerdem könnten mikrobiologisch nachgewiesene Keime als Auslöser der Erkrankung akzeptiert, ohne gründlich hinterfragt zu werden. Dies kann zum einen dazu führen, dass niedriger pathogene Keime therapiert werden, während ein nicht nachgewiesener Keim weiter florieren kann. Zum anderen wird durch die Wahl des in diesem Fall potenziell falschen Antibiotikums die Resistenzbildung gefördert (34, 42). Im Nachgang einer antibiotischen Therapie ist das Auge außerdem empfänglicher für erneute bakterielle Infektionen (60).

4.1 Anatomie & Physiologie

Konjunktiva und Cornea bilden gemeinsam die Oberfläche des Auges, die direkt mit der Umwelt in Kontakt steht. Die Funktionen dieser beiden Strukturen sind vielfältig und reichen von immunologischen bis refraktiven Aspekten.

4.1.1 Konjunktiva

Die Konjunktiva ist eine transparente Schleimhaut, die von der posterioren Seite der Lider über die Vorderfläche des Bulbus bis zur Cornea reicht. Der palpebrale Teil der Konjunktiva ist fest mit dem posterioren Tarsus verbunden. Der bulbäre Teil hingegen ist nur limbusnah fest mit der Tenonkapsel verwachsen und liegt dieser ansonsten verschieblich auf. Die Umschlagsfalten zwischen bulbärem und palpebralem Anteil werden Fornices conjunctivae genannt. Am Unterlid bildet dieser Teil den Saccus conjunctivae (7).

Histologisch besteht ihr Stroma aus lockerem Bindegewebe, das durch eine Basalmembran vom darüberliegenden mehrschichtigen nicht-verhornenden Epithel getrennt ist. Die Morphologie des Epithels variiert zwischen den Anteilen der Konjunktiva und ist im palpebralen Teil vorrangig hochprismatisch, im bulbären Teil eher abgeflacht. Im Bereich der Fornices verfügt das Epithel zusätzlich über Becherzellen (7, 36, 47). Im superioren palpebralen Teil enthält die Konjunktiva die akzessorischen Tränendrüsen und trägt damit zur Bildung eines suffizienten Tränenfilms bei (36). Weiterhin gehört auch die Einleitung und Regulierung von Abwehrmechanismen zur Aufgabe der Konjunktiva. Insbesondere in ihrem palpebralen Teil ist sie reich an lymphatischem Gewebe. Vorherrschende Zellpopulationen sind einerseits regulatorische und zytotoxische T-Zellen, andererseits Plasmazellen und T-Helferzellen, die sich in Follikeln organisieren können. Diese

Formation wird als Konjunktiva-assoziiertes lymphatisches Gewebe (*conjunctiva-associated lymphatic tissue*, CALT) interpretiert und ist maßgeblich für die Immunabwehr der Augenoberfläche verantwortlich (36).

4.1.2 Cornea

Die Cornea ist der zentrale Teil der Augenvorder- und -oberfläche. Sie bildet den Anteil der Augenoberfläche, durch den das Licht in die Vorderkammer einfällt und ist für etwa drei Viertel der Brechkraft des Auges verantwortlich. Sie ist eine klare, nahezu kreisrunde Struktur mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 11,5mm. Der Übergang zwischen Cornea und Sklera, der sie unmittelbar angrenzt, wird Limbus genannt. Im Zentrum beträgt ihre Dicke etwa 540µm und nimmt in der Peripherie zu. Die Hornhautdicke kann interindividuell variieren und ist z.B. für die Durchführbarkeit bestimmter operativer Eingriffe oder die Messung des intraokularen Drucks von Relevanz (8).

Nach außen hin wird die Cornea durch ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel bedeckt, das einer Basalmembran aufliegt, die in der Tiefe wiederum in die Bowman-Membran übergeht. Dieses Epithel hat die Fähigkeit sich aus der basalen Zellschicht heraus zu regenerieren und alte Zellen an der Oberfläche in den Tränenfilm abzugeben. Es schützt einerseits die Cornea vor äußeren Einflüssen, indem die äußeren Zellreihen durch Zonulae occludentes (*Tight Junctions*) zu einer regelrechten Barriere verbunden sind. Andererseits vergrößert es die Oberfläche durch Mikrovilli auf der äußersten Zellschicht. So wird eine bessere Nährstoffversorgung der Cornea gewährleistet, indem der Tränenfilm besser gebunden und zusätzlich die Diffusionsfläche vergrößert werden kann (5, 8).

Zur Vorderkammer hin befindet sich das Endothel. Es liegt der Descemetmembran auf, ist mit dieser jedoch nicht fest verbunden, sondern wird viel mehr durch den Augeninnendruck an der Membran gehalten. Der Zellverband des Endothels steht über Maculae communicantes (*Gap Junctions*) in Kommunikation und ist untereinander nicht okklusiv verbunden, sodass Kammerwasser parazellulär ins Stroma gelangen kann. Gleichzeitig sind die Endothelzellen die metabolisch aktivsten Zellen der Cornea und verfügen über ionengesteuerte Pumpen, mit deren Hilfe Flüssigkeit aus dem Stroma abgepumpt wird. Das Endothel sorgt dadurch dafür, dass Hornhautödeme vermieden werden und die Cornea klar bleibt (5, 8).

Das Stroma selbst besteht zum größten Teil aus parallel angeordneten Kollagenfasern. Diese Struktur ist für die Stabilität und Transparenz der Cornea von Bedeutung. Knapp 5% des Stromas machen Keratozyten aus. Sie produzieren Kollagen und Material zur Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix (5, 8).

Die Cornea selbst ist nicht vaskularisiert und erhält die notwendigen Nährstoffe durch Diffusion zum einen aus dem Kammerwasser, zum anderen aus dem Tränenfilm. Stoffwechselprodukte werden ebenfalls durch Diffusion entsorgt (8). Die Versorgung wird über verschiedene Mechanismen optimiert: einerseits sorgt die Anatomie des cornealen Epithels mit seinen Villi für eine große

Diffusionsfläche zwischen Cornea und Tränenfilm (5), andererseits reguliert die Cornea die Tränenfilmproduktion selbst. Gewährleistet werden kann diese Funktion durch die dichte Innervation: die Cornea ist der am dichtesten innervierte Teil des Körpers (8). Sie wird über den Nervus ophthalmicus durch den Nervus trigeminus versorgt. Innerhalb der Cornea erfolgt die Innervation durch sensorische Fasern, die bis in die oberflächlichen Epithelschichten ragen. Diese vereinigen sich unterhalb der Bowman-Membran zu einem subbasalen Plexus, der über stromale Nerven und die Nervi ciliares longi mit dem Nervus nasociliaris verbunden ist (66).

4.1.3 Tränenfilm

Der Tränenfilm liegt der Augenoberfläche dauerhaft auf. Er besteht aus drei Schichten, um verschiedene Schutzfunktionen zu übernehmen und die konstante Konfrontation mit der Umwelt zu tolerieren.

Die äußere Schicht ist eine Lipidschicht, deren Hauptfunktionen der Schutz vor Austrocknung und die Reduktion der Oberflächenspannung zur suffizienten Verteilung des Films auf der Oberfläche ist. Sie wird von den Meibom-Drüsen produziert (6).

Die mittlere Schicht ist eine wässrige Schicht mit gelösten Elektrolyten, Muzinen und Proteinen und wird zum größten Teil in den Haupttränendrüsen und zu einem kleinen Teil in den akzessorischen Tränendrüsen produziert. Ihre Funktionen sind vielfältig: sie versorgt die Cornea mit Sauerstoff und gleicht Unregelmäßigkeiten in ihrer Oberfläche aus (6). Des Weiteren ist sie an der Regulation entzündlicher Prozesse beteiligt, denn sie verfügt über Interleukine und Immunglobuline der Klasse A (IgA). Zusätzlich ist sie durch die Kombination aus mechanischem Auswaschen und dem Vorhandensein bakterizider Stoffe wie Lysozym und bakteriostatischer Stoffe wie Laktoferrin und Lipocalin zur Eradikation schädlicher Keime in der Lage (36, 41).

Die innere Schicht ist eine Muzinschicht. Sezernierte Muzine werden hauptsächlich von den konjunktivalen Becherzellen gebildet, während Transmembranmuzine von konjunktivalen und cornealen Epithelzellen produziert werden. Ihre Funktion besteht in der Konvertierung des hydrophoben cornealen Epithels in einen hydrophilen Film und damit der Bindung der wässrigen Schicht (6).

4.1.4 Zusammenfassung

Die Bestandteile der Augenoberfläche sind ein komplexes Gebilde, dessen Gesamtstruktur für gleich mehrere Funktionen verantwortlich, jedoch auch recht fragil ist. Die Funktionen reichen von optischen und refraktiven Aspekten, über die komplex organisierte Versorgung mit Nährstoffen, bis zu vielseitigen Schutzmechanismen. Diese Funktionen sind von einem intakten Zusammenspiel der einzelnen Strukturen abhängig. Beispielsweise reguliert die Cornea durch ihre afferenten Nervenfasern die Tränenproduktion und kann den Lidschluss zum mechanischen Schutz des Auges bzw. zum Auswaschen von Fremdkörpern oder Keimen initiieren. Gleichzeitig werden immunologische Reaktionen durch das CALT vermittelt und u.a. über den Tränenfilm verbreitet.

Werden Teile oder Schichten von Cornea oder Konjunktiva durch degenerative, traumatische oder entzündliche Prozesse beschädigt bzw. narbig umgebaut, kann dies dazu führen, dass einzelne Funktionen, aber auch das Zusammenspiel der einzelnen Strukturen, erheblich eingeschränkt werden.

4.2 Infektionen der Augenoberfläche - eine epidemiologische Einordnung

Welchen Stellenwert Entzündungen der Augenoberfläche haben, zeigt die Tatsache, dass heutzutage weltweit etwa 3% aller Erblindungen auf Trachome (51) und etwa 5% auf Hornhautnarben, z.B. in Folge von Keratitiden, (9, 22, 51) zurückzuführen sind. Dass es sich hierbei um Werte für beidseitige Erblindung handelt, lässt vermuten, dass der Anteil an einseitigen erheblichen Seheinschränkungen, bzw. beidseitigen Seheinschränkungen, die die Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) für Blindheit noch nicht erfüllen, deutlich höher ist. In Deutschland erscheinen entzündliche Geschehen nicht unter den häufigsten Erblindungsursachen (20). Mögliche Gründe hierfür sind z.B. die bessere Verfügbarkeit ophthalmologischer Versorgungsstrukturen und höhere Hygienestandards im Vergleich zu vielen Entwicklungsländern. Obwohl diese Daten aufgrund fehlender Meldepflichten lückenhaft sind und daher von einer Dunkelziffer auszugehen ist, zeigen diese Zahlen, welche schwerwiegenden Auswirkungen Entzündungen der Augenoberfläche haben können. Neben der visuellen Relevanz können Keratitiden zu sekundären behandlungsbedürftigen Problemen, beispielsweise Descemetocelen, Perforationen oder Sekundärglaukomen führen (58). Um diesen Risiken vorzubeugen und eine adäquate Therapie einzuleiten, ist die Identifikation des Erregers notwendig. Denn Fehldiagnosen sind häufig der Grundstein für therapieresistente Keratitiden (18). Trotz spezifischer klinischer Aspekte verschiedener Erreger, ist es selbst auf Hornhaut spezialisierten Kliniker:innen nur selten möglich ohne mikrobiologische Untersuchungen das Keimspektrum ausreichend zu differenzieren. Zwar kann in etwa zwei Drittel der Fälle rein klinisch zwischen bakteriellen und Pilzinfektionen unterschieden werden, doch bereits das Verhalten in der Gram-Färbung kann in nur weniger als der Hälfte der Fälle richtig vorausgesagt werden, die Gattung nur in etwa einem Viertel (12).

Dies veranschaulicht die hohe Relevanz mikrobiologischer Diagnostik im Rahmen der Versorgung entzündlicher Prozesse der Augenoberfläche.

4.3 Diagnostik bei bakterieller Konjunktivitis und Keratitis

Im Falle eines entzündlichen Geschehens auf der Augenoberfläche sollte vor Therapiebeginn mit Antibiotika Material zur Keimbestimmung gewonnen werden (64). Hinweise zur Vorgehensweise finden sich in den Leitlinien zur bakteriellen Konjunktivitis und Keratitis der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) und des Berufsverbands der Augenärzte Deutschlands e.V. (BVA) (14, 15).

Zur Materialgewinnung bei Keratitiden heißt es in der „Leitlinie Nr. 13 Keratitis“ der DOG und des BVA, es solle eine „oberflächliche Biopsie aus dem Ulcusgrund zur Keimbestimmung und zum

Erhalt eines Antibiotogramms“ entnommen werden (15). Für Konjunktividen ist laut „Leitlinie Nr. 12 Bakterielle Konjunktivitis“ der DOG und des BVA ein „Abstrich auf Bakterien oder Chlamydien, ggf. mit Resistenztestung“ vorgesehen (14) .

Genauere Anweisungen finden sich in der Leitlinie für „Mikrobiologische Diagnostik bei Infektionen des Auges“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) von 2011 (64). Hier finden sich sowohl allgemeine Hinweise zur Probennahme und Laboranalytik, als auch spezielle Hinweise für Konjunktividen und Keratitiden. Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit ist eine Überprüfung dieser Leitlinie angekündigt, eine Aktualisierung jedoch ausstehend.

Generell gilt, dass zu mikrobiologischen Zwecken Gewebeprobe Abstrichen vorzuziehen sind. Aufgrund der geringeren Invasivität werden Abstriche dennoch häufig genutzt. Die DGHM empfiehlt für Abstriche der Augenoberfläche die Nutzung von Kunstfaser-Tupfern mit Kunststoffschicht. Für Konjunktividen gilt, dass „mit einem Abstrichtupfer nach Abziehen des Unterlides die Konjunktiva im unteren Fornix in der gesamten Länge abgestrichen und der Abstrichtupfer ein paar Sekunden bis zur völligen Durchtränkung dort belassen werden“ soll (64). Aufgrund der potenziell bakterizid wirkenden Konservierungsmittel sollten die Abstriche ohne Lokalanästhetika durchgeführt werden. Angaben zu konservierungsmittelfreien Präparaten finden sich nicht. Für Keratitiden wird empfohlen, Material vom Ulkusgrund und Ulkusrand zu gewinnen (64).

Für den Transport der Proben hält die DGHM fest, dass die heutigen Transportmedien bei einer Transportzeit bis 24 Stunden eine ausreichende Konservierung gewährleisten. Im Labor selbst wird eine semiquantitative Analyse mittels Dreiösastrich angeraten (64).

Bezüglich der Nukleinsäurediagnostik, beispielsweise der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), besteht ein Konsens, dass sie bei Infektionen des Auges aufgrund nur kleiner Mengen Untersuchungsmaterial und geringer Konzentration an Erregern vor allem bei viralen Infektionen von Relevanz ist. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der Leitlinie in 2011 hielt die DGHM jedoch folgendes fest: „Aufgrund der bislang spärlichen Datenlage sowie dem fehlenden Vorliegen standardisierter Assays können eubakterielle Nukleinsäureamplifikationsverfahren bei Vorliegen einer ausreichenden Probenmenge als zusätzliche Verfahren, jedoch nicht als Ersatz für die konventionell mikrobiologische Diagnostik eingesetzt werden“ (64) .

4.4 Gegenstand bisheriger Forschung

4.4.1 Normalflora

Es gibt einige wissenschaftliche Erkenntnisse darüber, welche Rolle die Besiedlung des Auges für dessen Gesundheit spielt. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass das lymphatische Gewebe in Anwesenheit einer Normalflora Keime effektiver abwehren kann (38). Infektionen werden dabei durch die dauerhafte Besiedlung der Augenoberfläche unwahrscheinlicher (13, 60) und im Anschluss

an eine topische Antibiotikatherapie wahrscheinlicher (60). Des Weiteren besteht eine Korrelation zwischen einigen Syndromen, wie dem trockenen Auge, und dem Nachweis vermehrter Keimbesiedlung (23).

Die Bestimmung der Normalflora selbst spielt seit dem frühen 20. Jahrhundert eine Rolle in der Forschung (59). Seitdem konnten neben der Keimbestimmung auch wertvolle pathophysiologische Merkmale bestimmt werden. Hierzu gehört unter anderem, dass die meisten Bakterien nicht in der Lage sind, das intakte corneale Epithel zu durchdringen, während einige Spezies wie *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Listeria* und *Haemophilus* auch bei intaktem Epithel Infektionen hervorrufen können (63).

In einer der ältesten auffindbaren Dokumentationen zum Thema berichtete Smith 1954 (59), dass in etwas mehr als der Hälfte aller konjunktivalen Abstriche Keime nachweisbar waren. Hierunter waren *Corynebacterium xerosis* und Staphylokokken, insbesondere Koagulase-negative Staphylokokken, führend, die in etwa einem Drittel aller Proben kultivierbar waren. In einigen Fällen gelang es auch verschiedene Streptokokken, insbesondere *Streptococcus pneumoniae*, Moraxellen und „Coliforme“, d.h. gramnegative auf MacConkey-Agar wachsende Keime, nachzuweisen. Unter den Augen mit Entzündungszeichen gelang in knapp zwei Drittel der Proben ein Keimnachweis. Unter antibiotisch vorbehandelten Augen war der Anteil an positiven Kultursergebnissen um ca. 10% bei gesunden, bzw. 16% bei infizierten Augen niedriger (59).

In Bezug auf frühere Arbeiten stellte Smith Unterschiede in der Beschreibung der konjunktivalen Normalflora fest und äußerte bereits den Verdacht, dass diese Unterschiede unter anderem von geographischen Aspekten, insbesondere dem Klima, abhängen könnten (59). Mittlerweile liefern einige Studien Hinweise darauf, dass nicht nur lokale (24), sondern auch saisonale Unterschiede bestehen (57).

Insgesamt ist festzuhalten, dass unter den kultivierbaren Keimen hauptsächlich grampositive Keime zu finden sind. Führend sind hierbei Koagulase-negative Staphylokokken, insbesondere *Staphylococcus epidermidis*. Sie werden in etwa 50% aller konjunktivalen Proben nachgewiesen (65), je nach Quelle variiert dieser Wert zwischen etwa 30% (10) und 70% (52). Auch Actinomycetales, wie Propionibakterien und Corynebakterien, sowie *Staphylococcus aureus*, Streptokokken und Mikrokokken werden als Teil der kultivierbaren Normalflora beschrieben. Zusätzlich sind in seltenen Fällen Enterokokken oder gramnegative Keime wie Enterobacterales oder Pseudomonaden nachweisbar (10, 11, 52, 65). Die Rate an Proben, die keinen Keimnachweis erbrachten, variiert global sehr stark und hängt neben echten lokalen Unterschieden in der Normalflora am ehesten von Faktoren wie Entnahmetechnik, Proben transport und Kultivierbedingungen ab (24, 50, 65). In Bezug auf die Keimmenge werden generell kleine Mengen angegeben, die in der Regel unter 20 koloniebildenden Einheiten liegen (28, 40, 50, 61, 65).

Bisher konnten einige Studien zeigen, dass durch kulturbasierte Methoden nicht die gesamte Vielfalt des Mikrobioms erfasst werden kann (23). Aus diesem Grund werden zunehmend Daten mittels

Sequenzierung von 16S ribosomaler RNA und DNA gewonnen. In diesen Arbeiten zeigt sich eine erheblich größere Vielfalt der bakteriellen Besiedlung. Teilweise werden über 600 verschiedenen Genera detektiert (67). Genera, die dabei immer wieder auftauchen, sind beispielsweise *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, und *Propionibacterium* (16, 23, 32, 53, 67).

4.4.2 Erregerspektrum bei Keratitis und Konjunktivitis

Zu den häufigsten nachgewiesenen Erregern bei bakterieller Keratitis gehören in erster Linie Koagulase-negative Staphylokokken und Pseudomonaden (vor allem *Pseudomonas aeruginosa*). Aber auch *Staphylococcus aureus*, Streptokokken (vor allem *Streptococcus pneumoniae* und Viridans Streptokokken), Corynebakterien und Moraxellen werden häufig beobachtet (49). Für bakterielle Konjunktividen gilt *Haemophilus influenzae* als häufigster Erreger im Kindesalter, gefolgt von *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis*. Im Erwachsenenalter machen *Staphylococcus aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken den größten Anteil der Erreger aus. Doch auch hier werden *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae*, sowie Viridans-Streptokokken, *Moraxella catarrhalis* und Enterobacterales regelmäßig als Konjunktiviserreger beobachtet (2, 19, 31, 54).

4.4.3 Zusammenfassung und Problematik

Bereits 1884 formulierte Robert Koch die zentrale Frage nach dem Zusammenhang zwischen einem Erreger und einer Infektionskrankheit. In den Kochschen Postulaten heißt es, um den kausalen Zusammenhang zwischen Erreger und Erkrankung sicherzustellen müsse ein Keim lediglich bei Infektion, nicht jedoch bei gesunden mikroskopisch nachweisbar sein. Weiterhin müsse er kulturell anzüchtbar sein und bei Übertragung auf ein Versuchstier eben jene Infektionskrankheit auslösen (37, 44).

Auch heute ist die Frage der Kausalität zwischen Keim und Infektion ein zentraler Aspekt, der insbesondere für Therapieentscheidungen von großer Bedeutung ist. Die bisherige Forschung zur Besiedlung der Augenoberfläche konnte zeigen, dass diese im Gesunden kein steriler Ort ist. Jedoch wird trotz Anwesenheit bestimmter Bakterien im gesunden Zustand keine Immunreaktion durch Konjunktiva und Cornea hervorgerufen, das heißt bestimmte Keime scheinen zur dauerhaften Standortflora zu gehören (35). Es ist davon auszugehen, dass Abstriche bei entzündeten Augen jene Normalflora miterfassen, denn insbesondere Koagulase-negative Staphylokokken, aber auch *Staphylococcus aureus* und Corynebakterien sind sowohl in gesunden als auch entzündeten Stadien häufig nachweisbar. Durch PCR können sogar Keime wie Pseudomonaden und Streptokokken bei Gesunden zu finden sein.

Aufgrund dieser großen Schnittmenge an Keimen, die bei Gesunden und Infizierten nachgewiesen werden, ist die Bewertung der mikrobiologischen Ergebnisse, also der Pathogenität eines identifizierten Keims, im klinischen Umfeld oft schwer. Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation einiger Parameter als Indikatoren zur besseren Beurteilbarkeit der Befunde. Hierzu werden einerseits die Keimnachweisraten der einzelnen Keime statistisch aufgearbeitet. Andererseits soll analysiert werden,

ob die Keimmenge für bestimmte Erreger einen Mehrwert als zusätzlicher Parameter zur Unterscheidung zwischen eher pathogen, das heißt die Infektion tatsächlich bedingend, und eher apathogen, das heißt koinzidenziell aus der Normalflora mitbestimmt, darstellt. Hierdurch wollen wir einen Baustein für bessere und sicherere Therapieentscheidungen liefern.

5 Material und Methoden

5.1 Studienpopulation

Grundsätzlich wurden in dieser Studie zwei Personengruppen betrachtet.

Die erste Gruppe wird im Folgenden als Gruppe der Augengesunden bezeichnet. Als Proband:innen dieser Gruppe wurden Patient:innen rekrutiert, die zwischen Mai und September 2020 für ihre Behandlung die Hochschulambulanz in der Klinik für Augenheilkunde oder die Station 123 des Universitätsklinikums Gießen Marburg (UKGM) am Standort Marburg besuchten.

Eingeschlossen wurden volljährige Patient:innen, die mit einer Probenentnahme einverstanden waren und keines der Ausschlusskriterien erfüllten. Als Ausschlusskriterien galten aktive Entzündungen der Augenoberfläche, sowie lokale und/oder systemische antibiotische Behandlung innerhalb der zwei Wochen vor Probenentnahme. Die Patient:innen wurden mündlich und schriftlich über das Studienvorhaben und mögliche Risiken informiert und erteilten schriftlich ihr Einverständnis.

Da es sich hier um medizinische Forschung am Menschen handelt wurde vor Studienbeginn die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg hinzugezogen. Diese führt die Studie unter dem Aktenzeichen „Studie 45/20“ und erteilte am 08.05.2020 ein positives Votum.

Die zweite Gruppe wird im Folgenden als Gruppe mit vermuteter Infektion bezeichnet. Für diese Gruppe wurden Daten von Bindehaut- und Hornhautkratzabstrichen des Instituts für Mikrobiologie des UKGM am Standort Marburg gesichtet. Hierbei wurden nur Abstriche berücksichtigt, die zwischen Januar 2016 und September 2020 aufgrund des klinischen Bilds einer Infektion der Augenoberfläche durchgeführt wurden.

5.2 Studiendesign

Für die Gruppe der Augengesunden wurde die Studie als monozentrische Querschnittsstudie geplant. In Kombination mit den Daten der Gruppe mit vermuteter Infektion handelt es sich um eine historisch kontrollierte Studie.

Die Proband:innen beider Gruppen wurden zusätzlich in zwei Untergruppen geteilt. Dies diente dazu Keime einerseits insbesondere auf der Konjunktiva und andererseits auf der Cornea zu ermitteln. Im Folgenden werden die Abläufe in jeder der beiden Untergruppen separat dargestellt.

5.3 Probengewinnung

Die Verfahren zur Probengewinnung orientierten sich an den Standardverfahren der Klinik für Augenheilkunde des UKGM am Standort Marburg für Abstriche der Augenoberfläche.



Abbildung 1: Abstrich in der Fornix conjunctivae inferior

Ziel der Probennahme in der ersten der beiden Untergruppen war es insbesondere die Keimbesiedlung der Konjunktiva darzustellen. Hierzu wurde in der Gruppe der Augengesunden dieselbe Technik genutzt wie zur Gewinnung von Proben bei Vorliegen einer Konjunktivitis:

Die Augenoberfläche wurde zunächst mit Augentropfen betäubt. Hierbei wurde entsprechend den Informationen aus der DGHM Leitlinie aufgrund der bakteriziden Wirkung von Konservierungsmitteln (64) ein

konservierungsmittelfreies Präparat gewählt: Oxybuprocain (Conjucaïn EDO®). Zur Probennahme wurde anschließend mit einem Nylon-Flockfaser Abstrichtupfer (eSwab™) für einige Sekunden mit einer rotierenden Bewegung über die Fornix inferior conjunctivae gestrichen. Der Transport in das Labor erfolgte in einem flüssigen Transportmedium (modified liquid Amies, eSwab™).



Abbildung 2: Abstrich über der peripheren Cornea

Ziel der Probennahme in der zweiten Untergruppe war es, insbesondere die Keimbesiedlung der Cornea darzustellen. Standardmäßig werden bei Keratitiden Hornhautkratzabstriche entnommen. Da hierbei der Cornea, beispielsweise mithilfe eines scharfen Löffels, Gewebe entnommen wird, stellt dies ein sehr invasives Verfahren da. Der Ablauf des für die Gruppe der Augengesunden verwendeten wenig invasiven Verfahrens wich daher wie folgt von der Standardprozedur ab:

Wie in der Gruppe, die Bindehautabstriche erhielt, wurde die Augenoberfläche zunächst mit konservierungsmittelfreien Oxybuprocain Augentropfen betäubt. Statt nun corneales Gewebe wie bei einem Hornhautkratzabstrich zu entnehmen, wurde zur Probennahme mit einem Nylon-Flockfaser Abstrichtupfer für einige Sekunden mit einer rotierenden Bewegung über den peripheren, d.h. limbusnahen, Teil der Cornea gestrichen. Für den Transport ins Labor wurde, wie bei Hornhautkratzabstrichen üblich, eine Hirn-Herz Bouillon (*Brain Heart Infusion*, BHI) gewählt.

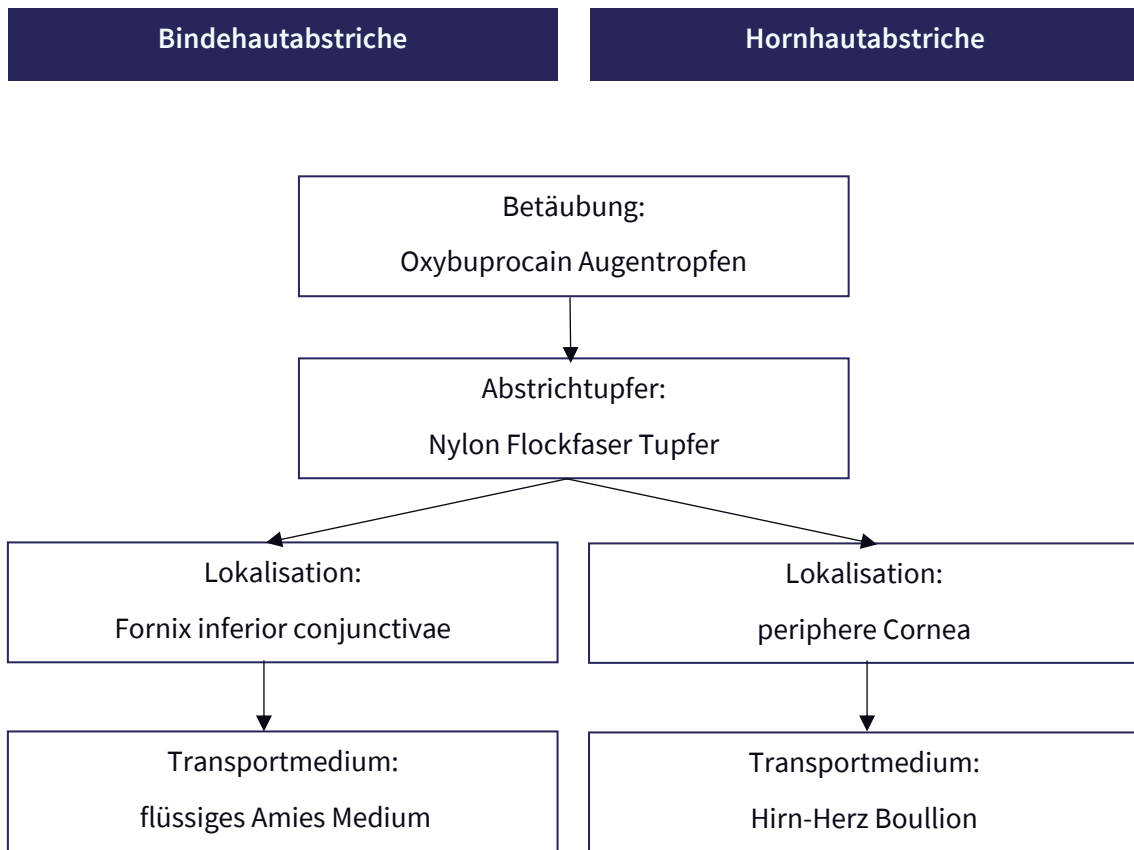


Abbildung 3: Schaubild zum Ablauf der Abstriche für die Gruppe der Augengesunden

5.4 Mikrobiologische Analysen

Die Probenanalyse erfolgte durch unseren Kooperationspartner, das Institut für Mikrobiologie des UKGM am Standort Marburg.

Je Probe wurden entsprechend dem klinischen Standard des Instituts für Mikrobiologie des UKGM am Standort Marburg Columbia-, Kochblut- und MacConkey-Agarplatten zur bakteriologischen Analytik mit einem Dreiösenausstrich beimpft. Dies diente dazu, Keime mit verschiedenen Ansprüchen kultivieren zu können:

1. Columbia-Agar dient der Kultivierung von sowohl grampositiven als auch gramnegativen Bakterien, sowie Pilzen der Gattung Candida. Es ermöglicht außerdem die Hämolyseeigenschaften der Bakterien zu differenzieren.
2. Kochblut-Agar dient dazu, auch Bakterien, die nicht hämolysierend wirken, z.B. Haemophilus influenzae, kultivieren zu können.
3. MacConkey-Agar ist ein Selektivnährboden zur Kultivierung gramnegativer Bakterien und ermöglicht zusätzlich die Differenzierung der Fermentierungseigenschaften der Bakterien.

Bei Bindehautabstrichen wurde zusätzlich zu den Agarplatten eine Hirn-Herz Boullion beimpft, sodass in beiden Gruppen drei Agarplatten und eine Hirn-Herz Boullion bei 36°C und 5% CO₂ für zunächst 24 Stunden bebrütet wurden. Sofern danach auf den Agarplatten kein Wachstum

nachweisbar war, die Hirn-Herz Boullion sich jedoch trüb färbte, wurden erneut Agarplatten mit Material aus der BHI beimpft und für 24 Stunden bebrütet. Zur Auswertung des Wachstums wurden die Agarplatten nach 24 und 48 Stunden beurteilt.

Bei Bindehautabstrichen wurde zusätzlich die Keimmenge eingeschätzt und in folgende Kategorien eingeteilt:

1. Als „spärlich“ wurde die Keimmenge beschrieben, wenn es nur vereinzelte koloniebildende Einheiten im Ausstrich der ersten Öse gab.
2. Als „mäßig“ wurde die Keimmenge beschrieben, wenn auch im Ausstrich der zweiten Öse koloniebildenden Einheiten nachweisbar
3. Als „reichlich“ wurde die Keimmenge beschrieben, wenn auch im Ausstrich der dritten Öse noch koloniebildende Einheiten zu finden waren.
4. Als „nach Anreicherung“ wurde die Keimmenge beschrieben, wenn erst nach Beimpfung der Agarplatten mit Material einer bereits 24 Stunden bebrüteten Hirn-Herz Boullion nachweisbar war.
5. „Kein Keimnachweis“ wurde angegeben, sofern nach 48 Stunden weder Agarplatten noch die Hirn-Herz Boullion Wachstum zeigten.

Für Hornhautabstriche war eine Bestimmung der Keimmenge nicht möglich, da die Hirn-Herz Boullion nicht nur Transport- sondern auch Nährmedium ist und daher bereits während des Transports ein relevantes Keimwachstum stattfand.

Zur Identifikation der gefundenen Keime wurde mithilfe des Maldi Biotyper der Firma Bruker eine matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie (*matrix associated laser desorption/ionisation - time of flight - massspectrometry*, MALDI-TOF-MS) und für potenziell pathogene Keime eine Resistenztestung mittels automatisierter Mikrodilutionsmethode im MicroScan WalkAway der Firma Beckman Coulter durchgeführt. Das heißt auf einer Mikrotiterplatte wurden Verdünnungsreihen verschiedener Antibiotika mit dem gefunden Keim beimpft und für 12 Stunden bebrütet. Ob und bei welcher Antibiotikakonzentration Wachstum auftrat, konnte anschließend automatisiert optisch ausgelesen werden, da bei Keimwachstum die Lösung im entsprechenden Nöpfchen eintrübte.

So konnte die Empfindlichkeit des gefundenen Keims gegenüber verschiedenen Antibiotika inklusive minimaler Hemmkonzentrationen bestimmt werden.

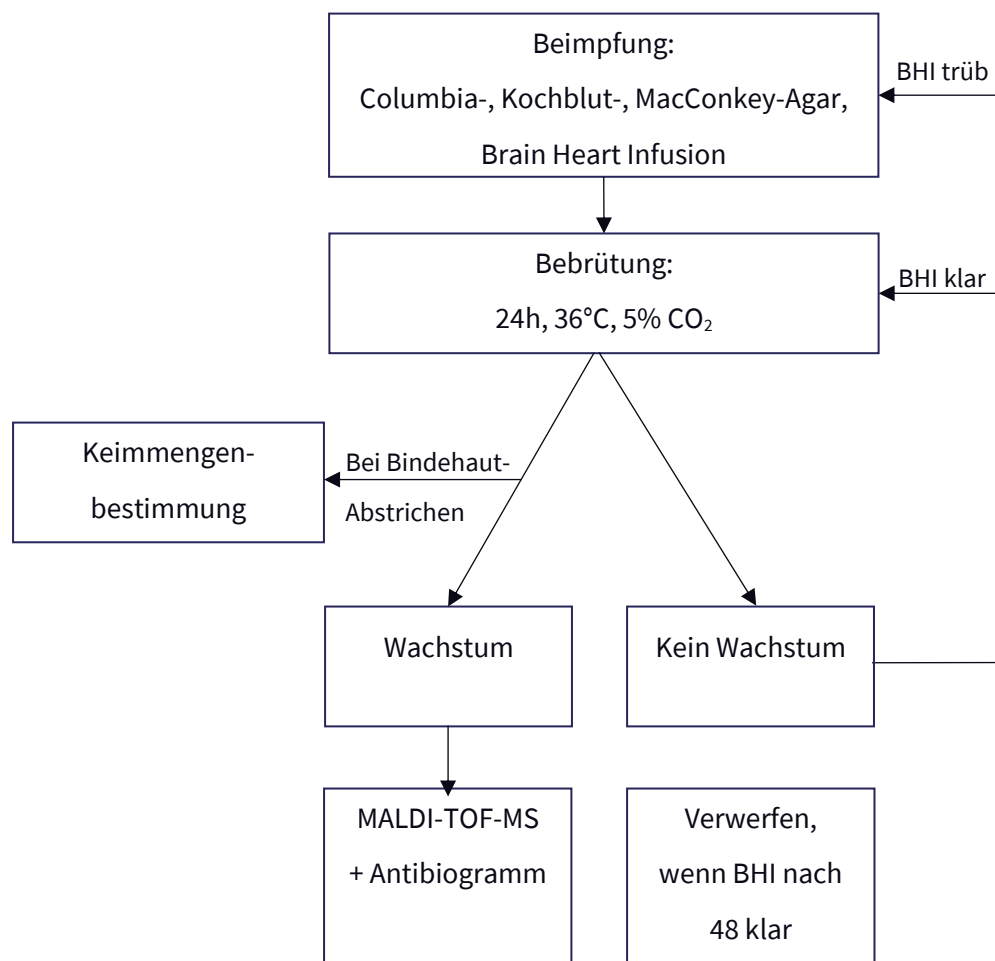


Abbildung 4: Schaubild zum Ablauf der mikrobiologischen Analysen

5.4.1 Exkurs: Keimbestimmung per Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein in den Naturwissenschaften weit verbreitetes Verfahren, um organische wie anorganische Substanzen auch in kleinsten Mengen bestimmen zu können. Das Prinzip der MS macht sich das $\frac{\text{Masse}}{\text{Ladung}}$ -Verhältnisses von Ionen zu Nutze. Diese Ionen entstehen in der klassischen MS in einem Hochvakuum durch Beschuss der Zielsubstanz mit Elektronen hoher kinetischer Energie. Die neu entstandenen Ionen werden danach mithilfe eines elektrischen Feldes in Richtung eines Detektors beschleunigt und dort analysiert.

In der modernen mikrobiologischen Analytik wird eine Variante der MS genutzt, die insbesondere zur Analyse von Proteinen geeignet ist: die MALDI-TOF-MS. Sie hat über die letzten zwei Jahrzehnte einen besonderen Stellenwert in der Mikrobiologie erlangt, da sie die Keimbestimmung selbst sehr kleiner Probenmengen mit hoher Genauigkeit innerhalb weniger Minuten ermöglicht.

Ein wesentliches Charakteristikum dieser MS-Variante ist die Ionisationsmethode, die matrixassoziierte Laserdesorption/Ionisation (MALDI). Bei dieser Methode werden Desorption und

Ionisation nicht durch Beschuss mit hochenergetischen Elektronen, sondern mit Photonen erreicht. Dabei ist es wichtig der Zersetzung der großen Moleküle der zu analysierenden Substanz vorzubeugen. Um dies zu gewährleisten wird die Probensubstanz vor der Ionisation in eine Matrix eingebettet, auf die die Wellenlänge der Photonen abgestimmt ist. Diese Matrix dient dazu, die Photonenenergie zu absorbieren und an die Probensubstanz weiterzugeben. Ein zweites Charakteristikum ist die Art der Analyse. Die Ionen werden hier nach ihrer Flugzeit (*time of flight*, TOF) analysiert. Hierzu wird jedem Ion in einem Hochvakuum durch ein elektrisches Feld die gleiche kinetische Energie zugeführt. In Abhängigkeit ihres $\frac{\text{Masse}}{\text{Ladung}}$ -Verhältnis erreichen die Ionen nun unterschiedliche Geschwindigkeiten. Durch Messung der Zeit, die die Ionen für den Weg durch einen feldfreien Raum bis zum Detektor benötigen, entsteht ein Spektrum, das die Identifikation der Makromoleküle, aus denen sich die Probe zusammensetzt, ermöglicht.

Da ein Großteil der analysierten Proteine zytoplasmatischen und ribosomalen Ursprungs sind, unterscheiden sich die Spektren verschiedener Keime voneinander. Das gemessene Spektrum wird im letzten Schritt mit bereits bekannten Spektren einzelner Keime, die in einer Datenbank hinterlegt sind, verglichen. Übereinstimmungen liefern dabei die entscheidenden Informationen zur Bestimmung des Keims (4, 46).

5.5 Endpunkte der Studie

Die Hauptfragestellung der Studie war, welche Keime die Augenoberfläche einerseits als Normalflora, andererseits als Erreger von Entzündungen besiedeln und in welcher Menge diese jeweils vorliegen. Nebenzielkriterien stellten hierbei Alter und Geschlecht der Proband:innen, sowie eine gegebenenfalls stattgehabte antibiotische Vorbehandlung dar.

5.6 Statistische Analysen

Zur Gewährleistung einer guten Vergleichbarkeit wurde die statistische Analyse der Daten separat für die Gruppe mit vermuteter Infektion und die Gruppe der Augengesunden vorgenommen. Aufgrund der zuvor beschriebenen verschiedenen Abstrich- und Analyseverfahren wurden beide Gruppen zusätzlich nach dem Abstrichverfahren, d.h. Bindehaut- bzw. Hornhautabstrich, unterteilt.

In der detaillierten deskriptiven Darstellung der Ergebnisse wurden sowohl absolute Zahlen als auch relative Angaben genutzt. Relative Angaben beziehen sich hierbei stets auf die Gesamtheit der jeweiligen Gruppe (z.B. die Anzahl aller Bindehautabstriche bei Augengesunden).

Neben der Beschreibung der einzelnen nachgewiesenen Keime wurden diese zur besseren Übersichtlichkeit und effektiveren Analyse nach ihrem Erscheinungsbild und dem Verhalten in der Gram-Färbung unterteilt.

Untersucht wurden dementsprechend:

1. Grampositive Kokken
2. Grampositive Stäbchen und Pleomorphe
3. Gramnegative Kokken
4. Gramnegative Stäbchen
5. Pilze

Wie in der Einleitung erwähnt sind einige bestimmte Keime bereits als Teil der okularen Normalflora identifiziert. Häufig werden diese Keime ebenfalls als klassische und häufige Keime, die bei Keratitiden und/oder Konjunktivitiden auftreten, beschrieben. Es erfolgte daher die separate statistische Analyse einiger einzelner Keime bzw. Familien zusätzlich zur Analyse nach der oben genannten Einteilung.

Auf Grundlage der bisherigen Forschung war zu erwarten, dass die Fraktion der grampositiven Kokken die größte unter den nachgewiesenen Keimen sein würde. Um diese Gruppe näher zu beleuchten, wurden innerhalb dieser Fraktion Koagulase-negative Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und Streptokokken separat statistisch analysiert. Da auch Coryne- und Propionibakterien einerseits als Teil der Normalflora, andererseits als häufige Erreger von Infektionen vorbeschrieben sind, wurden auch diese separat statistisch analysiert. Neben den bisher genannten wurden *Pseudomonas aeruginosa* bei Hornhautabstrichen und *Haemophilus influenzae* bei Bindehautabstrichen näher betrachtet, da sie als häufigste Erreger von Keratitiden bzw. Konjunktivitiden gelten, die eher nicht bei Augengesunden zu erwarten sind.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Klassen, die neben der oben genannten Einteilung separat statistisch betrachtet wurden:

1. Koagulase-negative Staphylokokken
2. *Staphylococcus aureus*
3. Streptokokken
4. Corynebakterien und Propionibakterien
5. *Pseudomonas aeruginosa* (bei Hornhautabstrichen)
6. *Haemophilus influenzae* (bei Bindehautabstrichen)

Anschließend wird untersucht, ob die beobachteten Effekte bezüglich der Unterschiede zwischen der Gruppe mit vermuteter Infektion und der Gruppe der Augengesunden statistisch signifikant sind. Untersucht wurden Unterschiede bezüglich

1. Keimnachweisrate
2. Nachweisraten der einzelnen Klassen
3. Nachgewiesene Keimmenge (nur für Bindehautabstriche).

Die Beschreibung der generellen Keimnachweisrate bzw. der Nachweisraten für die einzelnen Klassen, Keime und Familien erfolgte mithilfe von Vierfeldertafeln. Hierzu wurden die Tafeln nach folgendem Schema angelegt:

Tabelle 1: Vorlage einer Vierfeldertafel

	Gruppe 1	Gruppe 2
Prüfgröße 1	a	b
Prüfgröße 2	c	d

Neben der Nullhypothese, es gebe keinen Unterschied zwischen der Gruppe mit vermuteter Infektion und der Gruppe der Augengesunden, wurden zweiseitige Alternativhypothesen formuliert, die besagen, dass es einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen gäbe. Als Zielparameter zur Evaluation der Gültigkeit der Hypothesen wurde die Odds Ratio (OR) gewählt.

Es ergibt sich das Hypothesenpaar: $H_0: OR = 1$; $H_1: OR \neq 1$.

Zur Evaluierung des Einflusses eines Selektionsbias wurde zusätzlich untersucht, welchen Einfluss die antibiotische Vorbehandlung, d.h. Einleitung einer antibiotischen Behandlung im Vorfeld des Abstrichs, einerseits auf die generelle Keimnachweisrate, andererseits auf die Rate des Nachweises mehrerer Keime hat. Die Analyse erfolgt deskriptiv. Sofern nicht sicher war, ob eine antibiotische Vorbehandlung erfolgte, wurden die Abstriche für diese Analyse nicht berücksichtigt.

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz und Akzeptanz bzw. Verwerfung der Hypothesen wird der exakte χ^2 -Test nach R.A. Fisher (17, 21) genutzt. Die Durchführung erfolgt mithilfe der Statistik-Software R (55) und der Funktion `fisher.test`.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte neben der Angabe der p-Werte für die einzelnen Prüfgrößen auch grafisch durch Markierung des Signifikanzniveaus in den Abbildungen (*- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$) und durch die Angabe der OR mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall (KI) für die einzelnen Prüfgrößen. Nach der Vorlage aus Tabelle 1 zeigt eine Odds Ratio $OR > 1$, dass die Prüfgröße 1 eher mit der Gruppe 1 korreliert, während eine $OR < 1$ eine Korrelation eher mit der Gruppe 2 darstellt. Als Prüfgröße 1 gilt jeweils der Nachweis, als Prüfgröße 2 der fehlende Nachweis der untersuchten Klasse/des untersuchten Keims. Als Gruppe 1 gilt in der Regel die Gruppe der Augengesunden, als Gruppe 2 die Gruppe mit vermuteter Infektion. Für die Berechnung des Einflusses der antibiotischen Vorbehandlung gilt die Gruppe mit Vorbehandlung als Gruppe 1 und die Gruppe ohne Vorbehandlung als Gruppe 2.

Wie unter „Mikrobiologische Analysen“ beschrieben war es bei Bindehautabstrichen neben der Identifikation des Keims auch möglich Aussagen über die Keimmenge zu treffen. Die hier gewonnenen Daten wurden auf dem Niveau einer Ordinalskala angegeben:

- 1 – nach Anreicherung
- 2 – spärlich
- 3 – mäßig
- 4 – reichlich

Die Daten wurden wie folgt in Form einer Tabelle gesammelt:

Tabelle 2: Auszug aus dem zugrunde liegenden Datensatz

Keimmenge	Gruppe
1	0
1	1
1	0
3	0
4	0
2	0
2	1
3	0
2	1
1	1

Jede Zeile entspricht Angaben zu den Ergebnissen eines einzelnen nachgewiesenen Keims. Linke Spalte: ordinalskalierte Angabe der Keimmenge, rechte Spalte: Angabe zur Gruppenzugehörigkeit (1 – Gruppe der Augengesunden; 0 – Gruppe mit vermuteter Infektion)

Ob die beobachteten Unterschiede statistisch signifikant sind, wurde mithilfe des exakten Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests bestimmt. Unter Zuhilfenahme der Funktion `wilcox_test` (30) wurde auch hierfür die Statistik-Software R genutzt.

Zur Beurteilung des Unterschieds bezüglich der Keimmenge zwischen den beiden Gruppen wurde die einseitige Alternativhypothese formuliert, dass die nachgewiesene Keimmenge in der Gruppe mit vermuteter Infektion regelhaft größer sei als in der Gruppe der Augengesunden. Dementsprechend gilt als Nullhypothese, dass die nachgewiesene Keimmenge in der Gruppe der Augengesunden regelhaft gleich oder größer als in der Gruppe mit vermuteter Infektion sei. Wenn δ denjenigen Wert angibt, um den die Verteilung der Werte für die Keimmenge in der Gruppe mit vermuteter Infektion gegenüber der Verteilung in der Gruppe der Augengesunden verschoben ist, ergibt sich folgendes Hypothesenpaar:

$$H_0: \delta \leq 0; H_1: \delta > 0.$$

Neben der Untersuchung der Gesamtheit aller positiven Abstriche wurden äquivalent zur Untersuchung des Keimnachweises zusätzlich diejenigen Keime bzw. Klassen separat untersucht, die sowohl als Teil der Normalflora, als auch als klassische Erreger bei Infektionen vorbeschrieben sind. D.h. *Staphylococcus aureus*, Streptokokken, sowie Coryne- und Propionibakterien. Aufgrund der zu

erwartenden großen Fraktion der Koagulase-negativen Staphylokokken wird der Test ebenso für diese Fraktion durchgeführt.

5.7 Material und Geräte

Tabelle 3: Material

Material			
Zweck	Artikel	Hersteller	Firmensitz
Lokalanästhetikum	Conjucaïn® EDO®	Dr. Gerhard Mann	Berlin, Deutschland
	Augentropfen	chem.-pharm. Fabrik GmbH	
Abstrichtupfer	eSwab™	Copan Italia SpA	Brescia, Italien
Transportmedium	Liquid amies preservation medium	Copan Italia SpA	Brescia, Italien
Transport-und nährmedium	Brain Heart Infusion	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
		Oxoid Deutschland GmbH	Wesel, Deutschland
Nährmedien	Blut-, Kochblut-, MacConkey-Agarplatten	zur Verfügung gestellt vom Kooperationspartner: Institut für Mikrobiologie des UKGM am Standort Marburg	

Tabelle 4: Geräte

Geräte			
Zweck	Artikel	Hersteller	Firmensitz
Maldi-tof-ms	Maldi Biotyper	Bruker	Billerica, Massachusetts, USA
Resistenztestung	MicroScan WalkAway	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien, USA

6 Ergebnisse

6.1 Demographie

Im Rahmen dieser Studie wurden zwei Gruppen miteinander verglichen:

1. eine Gruppe mit klinisch vermuteter Infektion der Augenoberfläche, welche in der klinischen Routine einen Abstrich (Bindehautabstrich oder Hornhautkratzabstrich) zwischen Januar 2016 und September 2020 erhielt,
2. eine Gruppe ohne erkennbare Erkrankung der Augenoberfläche, welche als Vergleichsgruppe einen Bindehaut- oder Hornhautabstrich im Zeitraum zwischen Mai und September 2020 erhielt, im Folgenden Gruppe der Augengesunden genannt.

Insgesamt wurden 713 Abstriche von 689 Augen und 672 Personen analysiert. Davon fielen 499 Abstriche von 475 Augen und 458 Personen auf die Gruppe mit vermuteter Infektion, sowie 214 Abstriche von 214 Augen und Personen auf die Gruppe der Augengesunden. Zur Analyse der Daten wird mit den Ergebnissen aller Abstriche gearbeitet.

Die Gruppe der Augengesunden, die einen Bindehautabstrich erhielten, bestand aus 106 Abstrichen von 106 Personen. Hiervon waren 51 von Frauen im Alter von 19 bis 86 Jahren und 55 von Männern zwischen 18 und 89 Jahren. Das mittlere Alter in dieser Gruppe betrug 63 Jahre mit einer Standardabweichung von 18,6 Jahren. Die Gruppe von Bindehautabstrichen bei vermuteter Infektion bestand aus 222 Abstrichen. Hiervon fielen 94 auf Frauen im Alter von 0 bis 94 Jahren und 128 auf Männer zwischen 0 und 92 Jahren. In dieser Gruppe betrug das mittlere Alter 52,5 Jahre mit einer Standardabweichung von 24,6 Jahren.

Die Gruppe von Augengesunden, die einen Hornhautabstrich erhielten, beinhaltete 108 Abstriche. Sie setzte sich aus 61 Abstrichen bei Frauen zwischen 19 und 92 Jahren und 47 von Männern zwischen 21 und 83 Jahren zusammen. Das mittlere Alter in dieser Gruppe lag bei 65 Jahren mit einer Standardabweichung von 15,8 Jahren. Die Gruppe von Hornhautkratzabstrichen bei vermuteter Infektion bestand aus 277 Abstrichen, wovon 145 bei Frauen im Alter von 5 bis 92 Jahren und 132 bei Männern zwischen 5 und 90 Jahren durchgeführt wurden. Das mittlere Alter dieser Gruppe betrug 55,2 Jahre mit einer Standardabweichung von 22,6 Jahren.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Studienpopulation

Gesamt				
	Bindehautabstriche		Hornhautabstriche	
	Augengesunde	Vermutete Infektion	Augengesunde	Vermutete Infektion
Abstriche	713			
	328		385	
	106	222	108	277
Augen	689			
	320		369	
	106	214	108	261
Personen	672			
	304		368	
	106	198	108	260

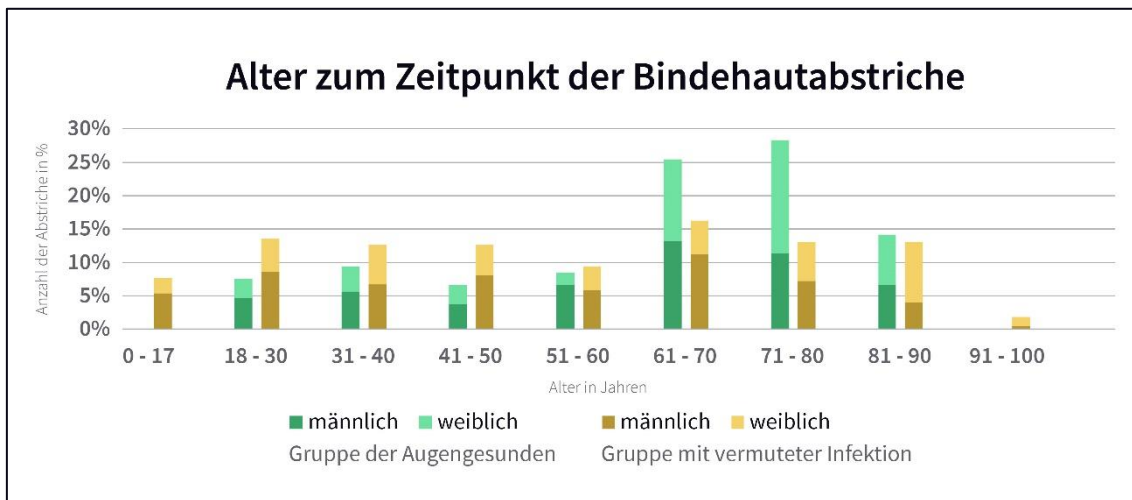


Abbildung 5: Verteilung von Alter und Geschlecht der Personen zum Zeitpunkt der Bindehautabstriche

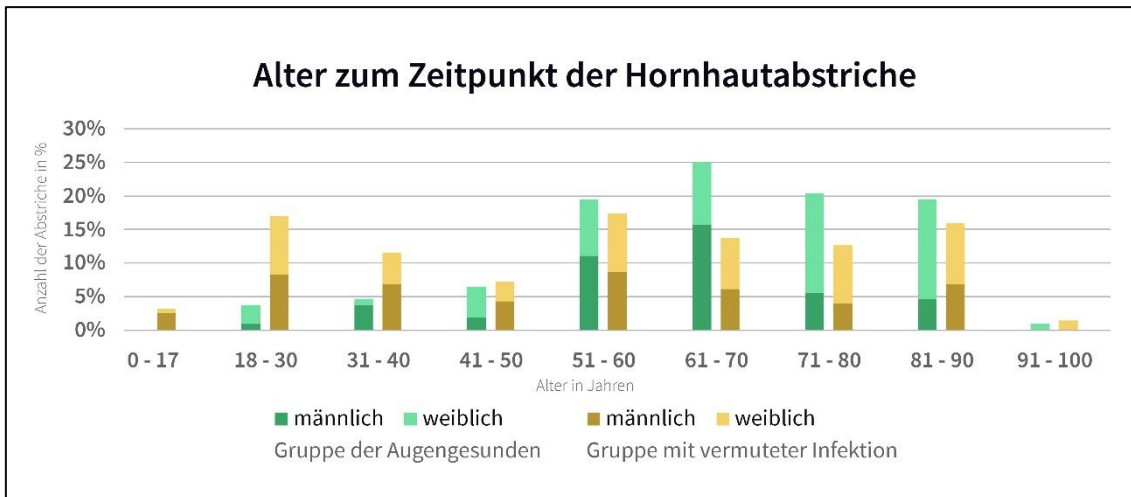


Abbildung 6: Verteilung von Alter und Geschlecht der Personen zum Zeitpunkt der Hornhautabstriche

6.2 Keimnachweisrate

Die Untersuchungen der Keimnachweisrate zeigten für die Gruppe der Augengesunden, dass 85 der 106 (80%) Bindehautabstriche und 86 der 108 (80%) Hornhautabstriche einen Keimnachweis erbrachten. 12 (11%) Bindehautabstriche erbrachten dabei den Nachweis von mindestens zwei verschiedenen Keimen, während es bei Hornhautabstrichen 5 (4,6%) waren. In der Gruppe mit vermuteter Infektion zeigten 132 von 222 (60%) Bindehautabstrichen und 169 von 277 (61%) Hornhautabstrichen einen Keimnachweis, wobei 34 (15) Bindehautabstriche und 19 (6,9%) Hornhautabstriche den Nachweis von mindestens zwei verschiedenen Keimen erbrachten.

In der Gegenüberstellung der Keimnachweisraten der Gruppe der Augengesunden und der Gruppe mit vermuteter Infektion ergab sich für Bindehautabstriche ein hoch signifikant häufigerer Keimnachweis in der Gruppe der Augengesunden (OR=2,75; 95%-KI: 1,56-5,0; $p < 0,001$). Auch für Hornhautabstriche ergibt sich dieser Effekt (OR=2,49; 95%-KI: 1,44-4,4; $p < 0,001$), sodass für beide Abstrichtechniken die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen werden konnte.

Bezüglich der Untersuchung, wie häufig mindestens zwei verschiedene Keime nachgewiesen wurden ergab sich weder für Bindehautabstriche (OR=0,71; 95%-KI: 0,32-1,48; $p=0,4$), noch für Hornhautabstriche (OR=0,66; 95%-KI: 0,19-1,89; $p=0,5$) ein Signifikanzniveau, dass für die Annahme der Alternativhypothese spräche, sodass die Nullhypothese hier nicht verworfen werden konnte.

Tabelle 6: Ergebnisse der Gegenüberstellung der Keimnachweisrate bei Augengesunden und Patient:innen mit vermuteter Infektion im exakten χ^2 -Test nach Fisher

	Keimnachweis			Nachweis mind. zweier verschiedener Keime		
	OR	95%-KI	p-Wert	OR	95%-KI	p-Wert
BH	2,75	1,56-5,0	<0,001	0,71	0,32-1,48	0,4
HH	2,49	1,44-4,4	<0,001	0,66	0,19-1,89	0,5

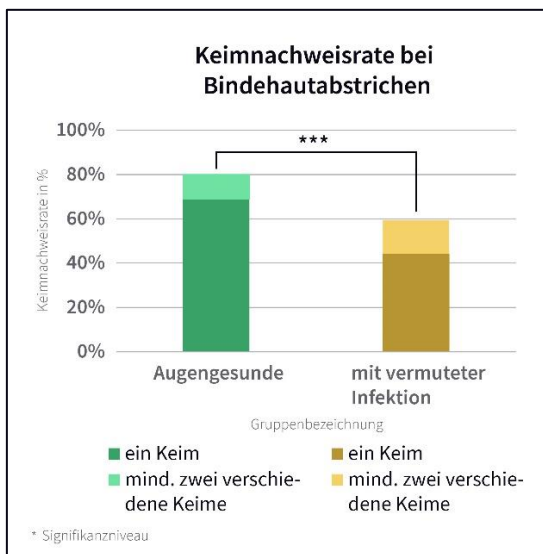


Abbildung 7: Keimnachweisraten bei Bindehautabstrichen

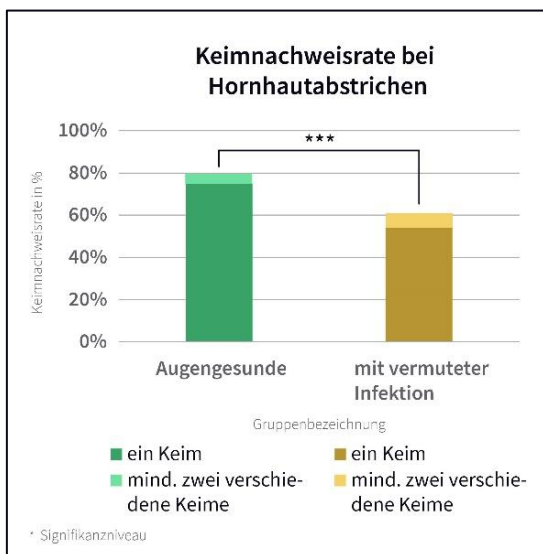


Abbildung 8: Keimnachweisraten bei Hornhautabstrichen

Abbildungen 7 und 8: Anteil von Abstrichen mit Keimnachweis an der Gesamtmenge von Abstrichen innerhalb der jeweiligen Gruppe. Die zusätzliche Unterteilung zeigt den Nachweis eines Keims (jeweils unten) sowie Nachweis mind. zweier verschiedener Keime (jeweils oben). Kennzeichnungen für p-Werte gelten für die Keimnachweisrate, nicht für den Nachweis mehrerer Keime.

6.3 Keimnachweisrate unter Berücksichtigung der Vorbehandlung

Unter Berücksichtigung einer antibiotischen Behandlung im Vorfeld des durchgeführten Abstrichs verschieben sich die oben genannten Werte. Für Proband:innen der Gruppe der Augengesunden galt eine antibiotische Vorbehandlung als Ausschlusskriterium, sodass für die folgende Gegenüberstellung die unter 5.2 genannten Werte dieser Gruppe Gültigkeit behalten. In der Gruppe mit vermuteter Infektion fand bei 115 von 222 (52%) Bindehautabstrichen im Vorfeld bereits eine antibiotische Behandlung statt. Bei 5 Bindehautabstrichen war unbekannt, ob eine Vorbehandlung

stattfand. Von den 277 Hornhautabstrichen erfolgten 125 (45%) nach antibiotischer Vorbehandlung. Bei 2 Hornhautabstrichen war der Status der Vorbehandlung unbekannt.

In der Betrachtung der Bindehautabstriche ergab sich ein Keimnachweis in 55 von 115 (48%) Abstrichen nach antibiotischer Vorbehandlung und in 75 von 102 (74%) ohne vorherige antibiotische Behandlung. Bei Hornhautabstrichen erfolgte der Keimnachweis in 67 von 125 (54%) Abstrichen nach antibiotischer Vorbehandlung und in 101 von 150 (67%) ohne antibiotische Vorbehandlung.

In der Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen ließ sich der zuvor beschriebene hoch signifikante Unterschied zwischen der Gruppe mit vermuteter Infektion und der der Augengesunden nicht verallgemeinern. So zeigte sich hinsichtlich der Keimnachweisrate in der Betrachtung ausschließlich der Bindehautabstriche ohne vorherige antibiotische Therapie kein signifikanter Unterschied zur Gruppe der Augengesunden (OR=1,45; 95%-KI: 0,73-2,95; p=0,3).

Für Hornhautabstriche zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Augengesunden und der Gruppe mit vermuteter Infektion und ohne antibiotische Vorbehandlung (OR=1,89; 95%-KI: 1,03-3,56; p=0,03).

Unter den 115 Bindehautabstrichen bei vermuteter Infektion und mit antibiotischer Vorbehandlung erfolgte in 10 (8,7%) der Nachweis mindestens zweier verschiedener Keime. Ohne antibiotische Vorbehandlung war der Nachweis mindestens zweier verschiedener Keime in 23 der 102 Fälle (23%) zu beobachten. Von 125 Hornhautabstrichen bei vermuteter Infektion und mit antibiotischer Vorbehandlung zeigten 5 (4,0%) den Nachweis mindestens zweier verschiedener Keime. Ohne antibiotische Vorbehandlung waren es 19 von 150 (6,9%).

Hierbei zeigte sich in der Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen, die einen Bindehautabstrich erhielten zwischen Augengesunden und Unvorbehandelten mit vermuteter Infektion ein signifikanter Unterschied (OR=0,44; 95%-KI: 0,19-0,99; p=0,04).

Für Hornhautabstriche konnte für die Gegenüberstellung der Gruppe der Augengesunden und der Gruppe ohne Vorbehandlung kein signifikanter Unterschied bezüglich des Nachweises mindestens zweier verschiedener Keime ermittelt werden (OR=0,47; 95%-KI: 0,13-1,45; p=0,2).

Tabelle 7: Ergebnisse der Gegenüberstellung der Keimnachweisrate bei Augengesunden und Patient:innen mit vermuteter Infektion unter Ausschluss der Vorbehandelten im exakten χ^2 -Test nach Fisher

	Keimnachweis			Nachweis mind. zweier verschiedener Keime		
	OR	95%-KI	p-Wert	OR	95%-KI	p-Wert
BH	1,45	0,72-2,95	0,3	0,44	0,19-0,99	0,04
HH	1,89	1,03-3,56	0,03	0,47	0,13-1,45	0,2

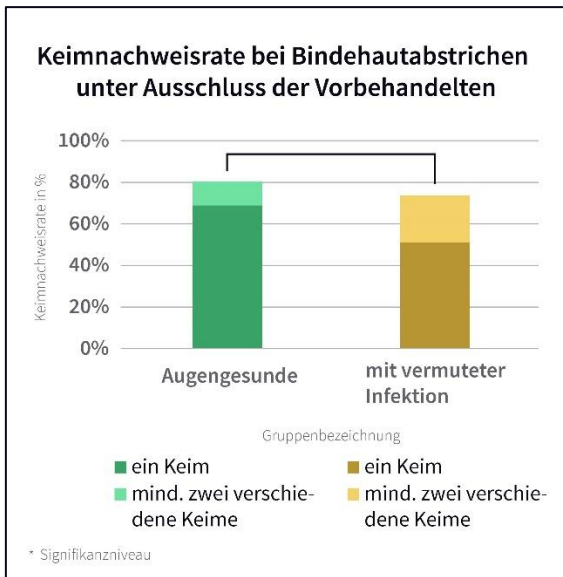


Abbildung 9: Keimnachweisraten bei Bindehautabstrichen unter Ausschluss der Vorbehandelten

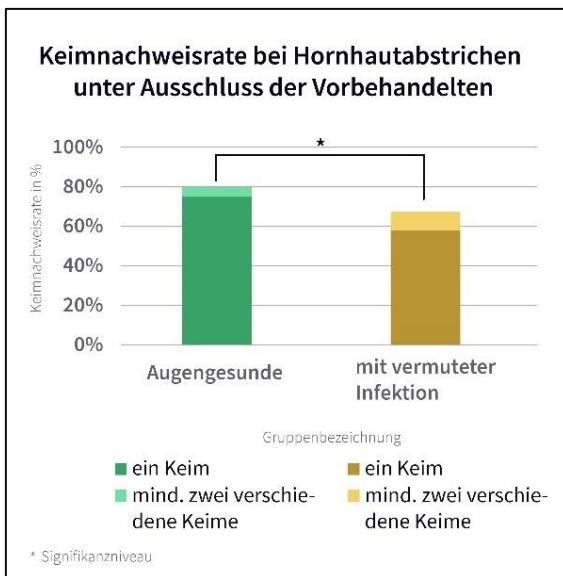


Abbildung 10: Keimnachweisraten bei Hornhautabstrichen unter Ausschluss der Vorbehandelten

Abbildungen 9 und 10: Anteil von Abstrichen mit Keimnachweis an der Gesamtmenge von Abstrichen innerhalb der jeweiligen Gruppe. Die Gruppe mit vermuteter Infektionen wird hier auf diejenigen ohne antibiotische Vorbehandlung reduziert. Die zusätzliche Unterteilung zeigt den Nachweis eines Keims (jeweils unten) sowie Nachweis mind. zweier verschiedener Keime (jeweils oben). Kennzeichnungen für p-Werte gelten für die Keimnachweisrate, nicht für den Nachweis mehrerer Keime.

6.4 Nachweisrate nach Gram-Verhalten und Erscheinungsbild

Unter allen Bindehaut- und Hornhautabstrichen wurden jeweils 37 verschiedene Keime nachgewiesen. Insgesamt wurden 54 verschiedene Keime nachgewiesen.

Unabhängig von der Zugehörigkeit zur Gruppe der Augengesunden oder zu der mit vermuteter Infektion waren grampositive Kokken die mit Abstand am häufigsten nachgewiesenen Keime. Für Augengesunde ergab sich, dass in 106 Bindehautabstrichen 95 (90%) Fälle eines Nachweises grampositiver Kokken vorlagen. In 108 Hornhautabstrichen waren es 88 (82%). In der Gruppe mit

vermuteter Infektion lagen in 222 Bindehautabstrichen 132 (60%) Fälle eines Nachweises grampositiver Kokken vor, in 277 Hornhautkratzabstrichen waren es 142 (51%).

Grampositive Stäbchen und Pleomorphe wurden bei Augengesunden in 1 (0,9%) von 106 Bindehautabstrichen und 0 (0%) von 108 Hornhautabstrichen gefunden. In der Gruppe mit vermuteter Infektion waren es 12 (5,4) von 222 Bindehautabstrichen und 21 (7,6%) von 277 Hornhautabstrichen.

Weiterhin wurden in einem (0,9%) der Bindehautabstriche und keinem der Hornhautabstriche bei Augengesunden gramnegative Kokken gefunden. Bei vermuteter Infektion konnten gramnegative Kokken in 4 (1,8%) der Bindehautabstriche und 5 (1,8%) der Hornhautabstriche nachgewiesen werden.

Der Nachweis gramnegativer Stäbchen gelang in keinem der Bindehautabstriche und 3 (2,8%) der Hornhautabstriche bei Augengesunden, während es 25 (11%) der Bindehautabstriche und 21 (7,6%) der Hornhautabstriche bei vermuteter Infektion waren.

Pilze konnten in einem (0,9%) der Bindehautabstriche und keinem der Hornhautabstriche bei Augengesunden nachgewiesen werden. In der Gruppe mit vermuteter Infektion gelang der Nachweis in einem (0,5%) der Bindehautabstriche und 2 (0,7%) der Hornhautabstriche.

In der Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen ergab sich, dass grampositive Kokken hochsignifikant häufiger bei Augengesunden nachgewiesen werden konnten. Dies war sowohl bei Bindehautabstrichen (OR=5,9; 95%-KI: 2,92-13; $p < 0,001$), als auch bei Hornhautabstrichen (OR=4,2; 95%-KI: 2,39-7,6; $p < 0,001$) der Fall.

Für grampositive Stäbchen und Pleomorphe ergab sich kein signifikanter Effekt bei Bindehautabstrichen (OR=0,167; 95%-KI: 0,004-1,16; $p = 0,07$), jedoch ein sehr signifikanter Effekt für Hornhautabstriche (OR=1x10⁻¹⁰; 95%-KI: 1x10⁻¹⁰-0,47; $p = 0,002$) im Sinne eines häufigeren Nachweises bei vermuteter Infektion.

Die Betrachtung der gramnegativen Kokken zeigte weder für Bindehautabstriche (OR=0,70; 95%-KI: 0,01-8,8; $p = 1$), noch für Hornhautabstriche (OR=1x10⁻¹⁰; 95%-KI: 1x10⁻¹⁰-3,89; $p = 0,6$) einen signifikanten Effekt.

Für gramnegative Stäbchen ergab sich ein hochsignifikanter Effekt bei Bindehautabstrichen (OR=1x10⁻¹⁰; 95%-KI: 1x10⁻¹⁰⁰-0,29; $p < 0,001$) im Sinne eines häufigeren Nachweises bei vermuteter Infektion. Für Hornhautabstriche zeigte sich kein signifikanter Effekt (OR=0,33; 95%-KI: 0,06-1,14; $p = 0,07$).

Für die Gruppe der Pilze ergab sich weder für Bindehautabstriche (OR=2,10; 95%-KI: 0,03-165; $p = 0,5$), noch für Hornhautabstriche (OR=1x10⁻¹⁰; 95%-KI: 1x10⁻¹⁰-13; $p = 1$) ein signifikanter Effekt.

Tabelle 8: Ergebnisse der Gegenüberstellung der Nachweisrate nach Gram-Verhalten bei Augengesunden und Patient:innen mit vermuteter Infektion im exakten χ^2 -Test nach Fisher

		OR	95%-KI	p-Wert
grampositive Kokken	BH	5,9	2,92 - 13	<0,001
	HH	4,2	2,39 - 7,6	<0,001
grampositive Stäbchen und Pleomorphe	BH	0,167	0,004 - 1,16	0,07
	HH	1×10^{-10}	1×10^{-10} - 0,47	0,002
gramnegative Kokken	BH	0,70	0,01 - 8,8	1
	HH	1×10^{-10}	1×10^{-10} - 3,89	0,6
gramnegative Stäbchen	BH	1×10^{-10}	1×10^{-100} - 0,29	<0,001
	HH	0,33	0,06 - 1,14	0,07
Pilze	BH	2,10	0,03 - 165	0,5
	HH	1×10^{-10}	1×10^{-10} - 13	1

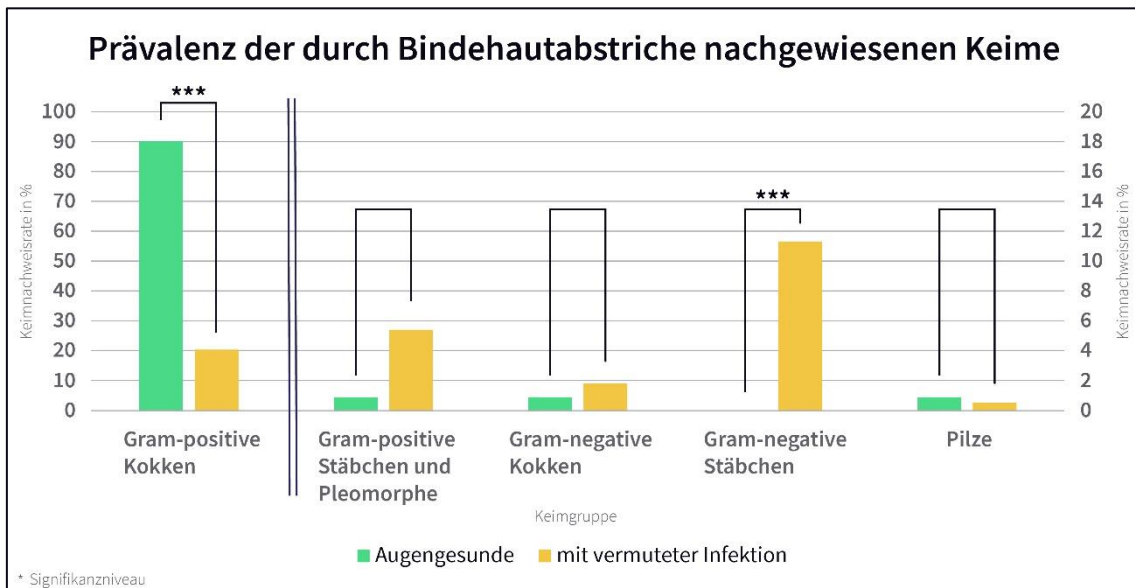


Abbildung 11: Keimnachweisraten der Keimgruppen bei Bindehautabstrichen

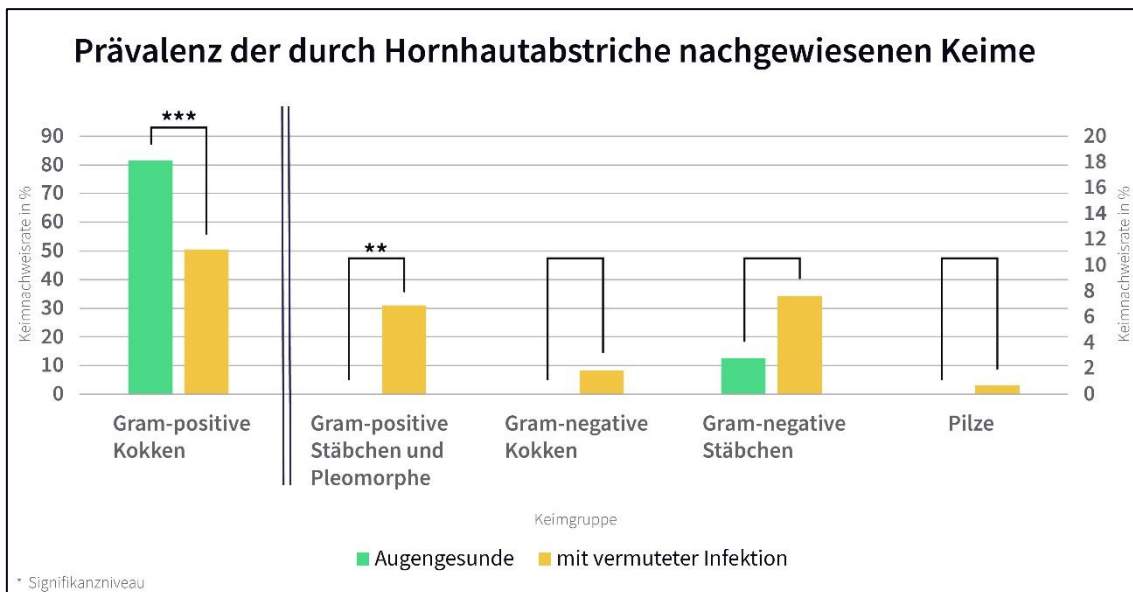


Abbildung 12: Keimnachweisraten der Keimgruppen bei Hornhautabstrichen

5.5 Nachweisrate innerhalb spezieller Klassen

Unter den Klassen, die in den Fokus gerückt wurden, waren die Koagulase-negativen Staphylokokken die größte Fraktion. Sie konnten unter 106 Bindehautabstrichen in 85 (80%) Fällen und unter 108 Hornhautabstrichen in 81 (75%) Fällen bei Augengesunden nachgewiesen werden. Bei vermuteter Infektion konnten sie in 78 (35%) von 222 Bindehautabstrichen und 83 (30%) von 277 Hornhautabstrichen nachgewiesen werden.

Staphylococcus aureus wurde in 10 (9,4%) der Bindehautabstriche und 5 (4,6%) der Hornhautabstriche bei Augengesunden nachgewiesen. Bei vermuteter Infektion wurde er in 37 (17%) der Bindehautabstriche und 41 (15%) der Hornhautabstriche nachgewiesen.

Der Nachweis von Streptokokken erfolgte in keinem der Bindehautabstriche und einem (0,9%) der Hornhautabstriche bei Augengesunden, sowie bei 14 (6,3%) der Bindehautabstriche und 15 (5,4%) der Hornhautabstriche bei vermuteter Infektion.

Coryne- und Propionibakterien konnten in einem (0,9%) der Bindehautabstriche und keinem der Hornhautabstriche bei Augengesunden nachgewiesen werden. Bei vermuteter Infektion waren es 7 (3,2%) der Bindehautabstriche und 16 (5,8%) der Hornhautabstriche.

Für Bindehautabstriche wurde der Nachweis von *Haemophilus influenzae* näher betrachtet. Dieser konnte in keinem der Abstriche bei Augengesunden und 8 (3,6%) der Abstriche bei vermuteter Infektion nachgewiesen werden.

Äquivalent wurde für Hornhautabstriche die Nachweisrate von *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Er wurde in keinem der Abstriche bei Augengesunden und 12 (4,3%) der Abstriche bei vermuteter Infektion nachgewiesen.

In der statistischen Analyse ergab sich, dass Koagulase-negative Staphylokokken bei Bindehautabstrichen (OR=7,4; 95%-KI: 4,2-13; $p < 0,001$) und Hornhautabstrichen (OR=7,0; 95%-KI: 4,1-12; $p < 0,001$) hochsignifikant häufiger in der Gruppe der Augengesunden nachgewiesen wurden.

Für *Staphylococcus aureus* konnte bei Bindehautabstrichen kein signifikanter Effekt beobachtet werden (OR=0,52; 95%-KI: 0,22-1,13; $p = 0,09$), während bei Hornhautabstrichen ein sehr signifikanter Effekt im Sinne eines häufigeren Nachweises bei vermuteter Infektion beobachtet werden konnte (OR=0,28; 95%-KI: 0,08-0,74; $p = 0,005$).

In der Betrachtung der Gruppe der Streptokokken zeigte sich, jeweils im Sinne eines häufigeren Nachweises bei vermuteter Infektion, ein sehr signifikanter Effekt bei Bindehautabstrichen (OR= 1×10^{-100} ; 95%-KI: 1×10^{-100} -0,61; $p = 0,006$) und ein signifikanter Effekt bei Hornhautabstrichen (OR=0,16; 95%-KI: 0,004-1,09; $p = 0,05$).

Für Coryne- und Propionibakterien konnte bei Bindehautabstrichen kein signifikanter Effekt beobachtet werden (OR=0,29; 95%-KI: 0,006-2,33; $p = 0,4$). Für Hornhautabstriche ergab sich jedoch ein sehr signifikanter Effekt im Sinne eines häufigeren Nachweises bei vermuteter Infektion (OR= 1×10^{-10} ; 95%-KI: 1×10^{-10} -0,64; $p = 0,008$).

In der Untersuchung der Nachweisraten von *Haemophilus influenzae* bei Bindehautabstrichen ergab sich kein signifikanter Effekt (OR= 1×10^{-100} ; 95%-KI: 1×10^{-100} -1,21; $p = 0,06$).

In der analogen Untersuchung von *Pseudomonas aeruginosa* bei Hornhautabstrichen zeigte sich ein signifikanter Unterschied (OR= 1×10^{-10} ; 95%-KI: 1×10^{-10} -0,90; $p = 0,02$).

Tabelle 9: Ergebnisse der Gegenüberstellung der Nachweisrate der einzelnen Keime bzw. Keimklassen bei Augengesunden und Patient:innen mit vermuteter Infektion im exakten χ^2 -Test nach Fisher

		OR	95%-KI	p-Wert
Koagulase-negative Staphylokokken	BH	7,4	4,2 – 13	1×10^{-14}
	HH	7,0	4,1 – 12	1×10^{-15}
<i>Staphylococcus aureus</i>	BH	0,52	0,22 - 1,13	0,09
	HH	0,28	0,08 - 0,74	0,005
Streptokokken	BH	1×10^{-100}	1×10^{-100} - 0,61	0,006
	HH	0,16	0,004 - 1,09	0,049
Coryne- & Propionibakterien	BH	0,29	0,006 - 2,33	0,4
	HH	1×10^{-10}	1×10^{-10} - 0,64	0,008
<i>Haemophilus influenzae</i>	BH	1×10^{-100}	1×10^{-100} - 1,21	0,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HH	1×10^{-10}	1×10^{-10} - 0,90	0,02

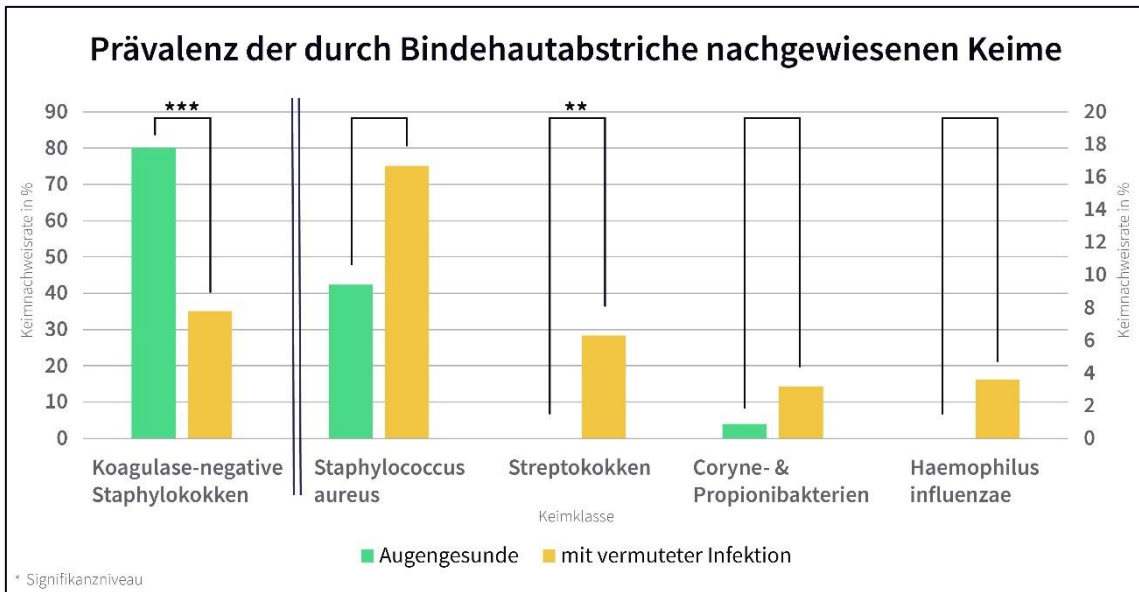


Abbildung 13: Keimnachweisraten der einzelnen Keime bzw. Keimklassen bei Bindehautabstrichen

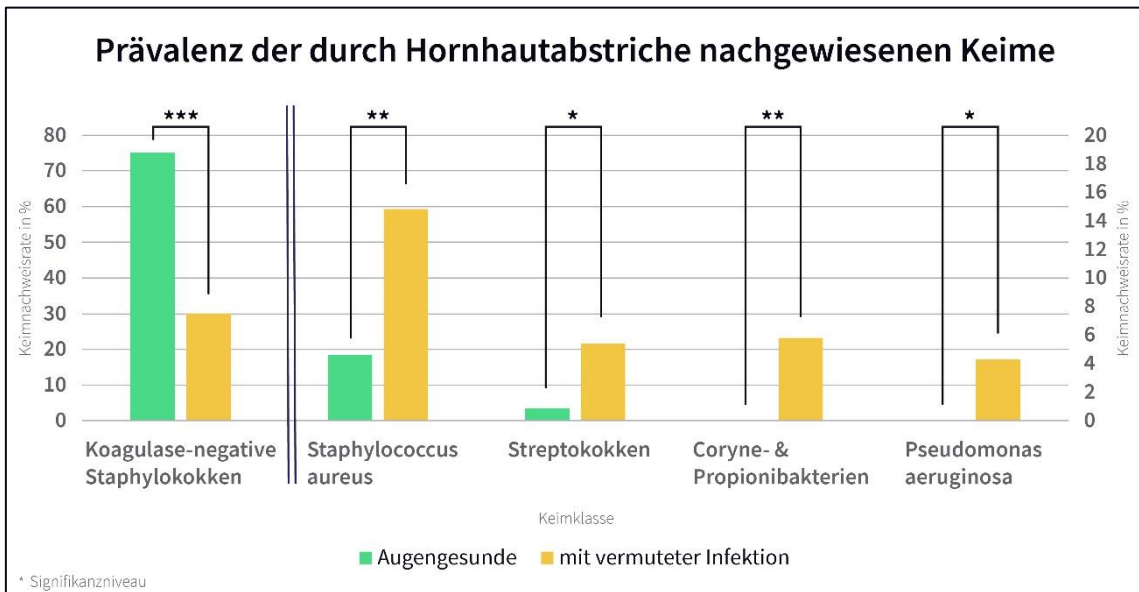


Abbildung 14: Keimnachweisraten der einzelnen Keime bzw. Keimklassen bei Hornhautabstrichen

Tabelle 10: Prävalenz der durch Bindehautabstriche nachgewiesenen Keime

Keim	Bei vermuteter Infektion	Bei Augengesunden
	n (%)	n (%)
Gram-positive Kokken	132 (60)	95 (90)
<i>Enterococcus sp.</i>	3 (1,4)	0 (0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	37 (17)	10 (9,4)
<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (0,5)	6 (5,7)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	0 (0)	1 (0,9)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0 (0)	71 (67)
<i>Staphylococcus hominis</i>	0 (0)	1 (0,9)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1 (0,5)	4 (3,8)
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0 (0)	1 (0,9)
<i>Staphylococcus sp. (koag.-neg. *)</i>	75 (34)	0 (0)
<i>Staphylococcus warneri</i>	1 (0,5)	1 (0,9)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2 (0,9)	0 (0)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2 (0,9)	0 (0)
<i>Streptococcus sp. (n. häm. **)</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Streptococcus sp. (vergrünend)</i>	9 (4,1)	0 (0)
Gram-positive Stäbchen und Pleomorphe	12 (5,4)	1 (0,9)
<i>Actinomyces israelii</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Bacillus sp.</i>	2 (0,9)	0 (0)
<i>Corynebacterium accolens</i>	0 (0)	1 (0,9)
<i>Corynebacterium sp.</i>	6 (2,7)	0 (0)
<i>Lactobacillus sp.</i>	2 (0,9)	0 (0)
<i>Propionibacterium propionicum</i>	1 (0,5)	0 (0)
Gram-negative Kokken	4 (1,8)	1 (0,9)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2 (0,9)	0 (0)
<i>Moraxella osloensis</i>	1 (0,5)	1 (0,9)
<i>Neisseria sp.</i>	1 (0,5)	0 (0)
Gram-negative Stäbchen	25 (11)	0 (0)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Burkholderia cepacia species</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Escherichia coli</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Haemophilus influenzae</i>	8 (3,6)	0 (0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Morganella morganii</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 (2,7)	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 (0,5)	0 (0)
Pilze	1 (0,5)	1 (0,9)
<i>Candida albicans</i>	1 (0,5)	0 (0)
<i>Candida parapsilosis</i>	0 (0)	1 (0,9)

Keimnamen wie in den Befunden des Instituts für Mikrobiologie angegeben. Detailbestimmungen innerhalb einer Species sind im klinischen Alltag zum Teil nicht erfolgt bzw. waren zum Teil nicht möglich; *-Koagulase-negativ, **-nicht hämolysierend

Tabelle 11: Nachweisraten der einzelnen Keime bei Hornhautabstrichen

Keim	Bei vermuteter Infektion	Bei Augengesunden
	n (%)	n (%)
Gram-positive Kokken	142 (51)	88 (82)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 (0,7)	0 (0)
<i>Enterococcus sp.</i>	0 (0)	1 (0,9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	41 (15)	5 (4,6)
<i>Staphylococcus capitis</i>	8 (2,9)	5 (4,6)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	54 (20)	72 (67)
<i>Staphylococcus hominis</i>	5 (1,8)	2 (1,9)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1 (0,4)	2 (1,9)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Staphylococcus sp.</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Staphylococcus sp (koag.-neg*.)</i>	10 (3,6)	0 (0)
<i>Staphylococcus warneri</i>	3 (1,1)	0 (0)
<i>Streptococcus oralis</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6 (2,2)	0 (0)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2 (0,7)	0 (0)
<i>Streptococcus sp (vergrünend)</i>	5 (1,8)	1 (0,9)
<i>Streptococcus suis</i>	1 (0,4)	0 (0)
Gram-positive Stäbchen und Pleomorphe	21 (7,6)	0 (0)
<i>Bacillus sp.</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Corynebacterium striatum</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Micrococcus luteus</i>	3 (1,1)	0 (0)
<i>Propionibacterium acnes</i>	14 (5,1)	0 (0)
Gram-negative Kokken	5 (1,8)	0 (0)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	3 (1,1)	0 (0)
<i>Neisseria sp..</i>	1 (0,4)	0 (0)
Gram-negative Stäbchen	21 (7,6)	3 (2,8)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Citrobacter sp.</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Enterobacter cloacae komplex</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Escherichia coli</i>	2 (0,7)	1 (0,9)
<i>Morganella morganii</i>	0 (0)	1 (0,9)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (0,4)	1 (0,9)
<i>Proteus vulgaris</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 (4,3)	0 (0)
<i>Serratia liquefaciens</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (0,4)	0 (0)
Pilze	2 (0,7)	0 (0)
<i>Aspergillus terreus</i>	1 (0,4)	0 (0)
<i>Candida albicans</i>	1 (0,4)	0 (0)

Tabelle 10 und 11: Keimnamen wie in den Befunden des Instituts für Mikrobiologie angegeben. Detailbestimmungen innerhalb einer Species sind im klinischen Alltag zum Teil nicht erfolgt bzw. waren zum Teil nicht möglich; *-Koagulase-negativ

6.6 Keimmenge

Hinsichtlich der Bestimmung der Keimmengen bei Bindehautabstrichen, die einen Keimnachweis erbrachten, ergab sich, dass in der Gruppe der Augengesunden 20 (20%) der 98 gefundenen Keime erst nach prolongierter Anreicherungsphase in der Hirn-Herz Bouillon nachweisbar waren. In der Gruppe mit vermuteter Infektion waren es 36 (21%) von insgesamt 174 gefundenen Keimen. 73 (75%) der bei Augengesunden nachgewiesenen Keime lagen in spärlicher Menge vor, während es bei vermuteter Infektion 94 (54%) waren. Eine mäßige Keimmenge konnte in 5 (5,1%) Fällen bei Augengesunden und 37 (21%) Fällen bei vermuteter Infektion beobachtet werden. Reichliche Keimmengen wurden bei Augengesunden nicht beobachtet, bei vermuteter Infektion lagen sie in 4 (2,3%) Fällen vor.

In der Analyse durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zeigte sich, dass die beobachtete Keimmenge in der Gruppe mit vermuteter Infektion signifikant größer war als in der Gruppe der Augengesunden ($p=0,01$)

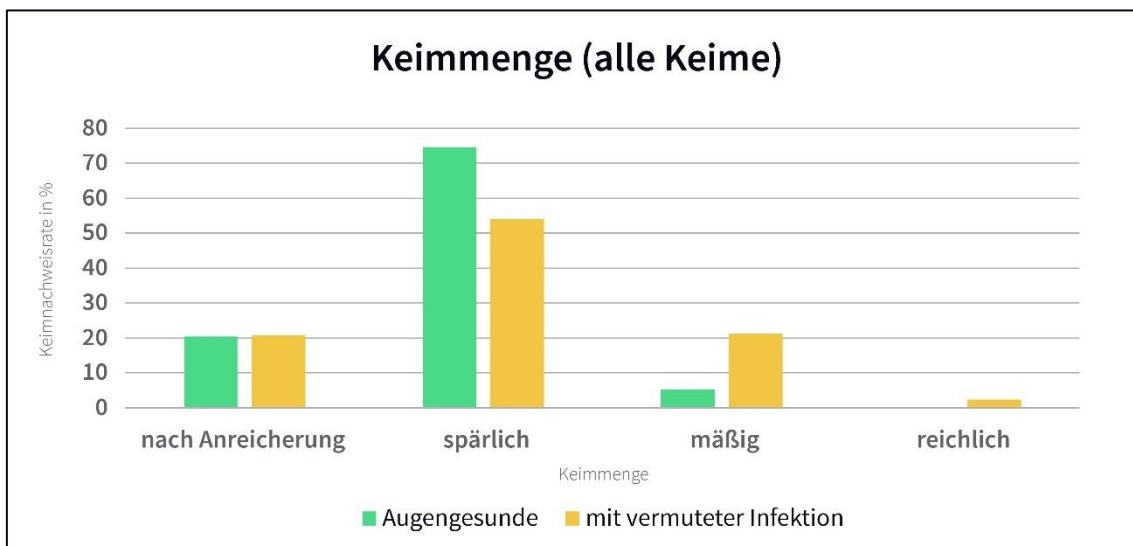


Abbildung 15: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung aller Keime

In der Betrachtung ausschließlich der Koagulase-negativen Staphylokokken zeigte sich, dass 19 (22%) von 85 gefundenen Keimen erst nach Anreicherung nachweisbar waren. Bei vermuteter Infektion waren es 23 (30%) von 78. Bei Augengesunden lagen sie in 62 (73%) Fällen spärlich vor, bei vermuteter Infektion in 51 (65%) Fällen. Mäßig lagen in der Gruppe der Augengesunden 4 (4,7%) und in der Gruppe mit vermuteter Infektion 3 (3,8%) Keime vor. Reichlich war 1 (1,3%) Keim in der Gruppe mit vermuteter Infektion zu beobachten.

Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergab sich hinsichtlich größerer Keimmengen bei vermuteter Infektion keine Signifikanz ($p=0,8$).

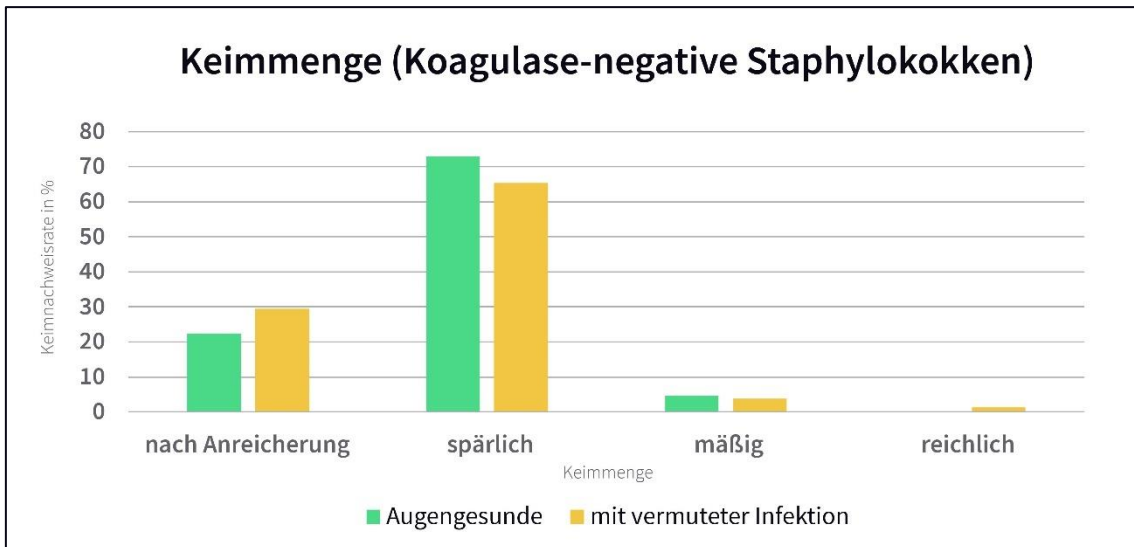


Abbildung 16: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung Koagulase-negativer Staphylokokken

Staphylococcus aureus war bei Augengesunden in 1 (10%) von 10 Fällen nach Anreicherung nachzuweisen, bei vermuteter Infektion war dies in 5 (14%) von 37 der Fall. Spärlich war er in 8 (80%) Fällen bei Augengesunden und in 14 (38%) bei vermuteter Infektion nachzuweisen. In 1 (10%) Fall der Augengesunden und 15 (41%) bei vermuteter Infektion lag er mäßig vor. Reichlich war er in 3 (8,1%) Fällen bei vermuteter Infektion zu beobachten.

Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergab sich hierbei, dass die Keimmenge bei vermuteter Infektion signifikant höher ist als bei Augengesunden ($p=0,04$).

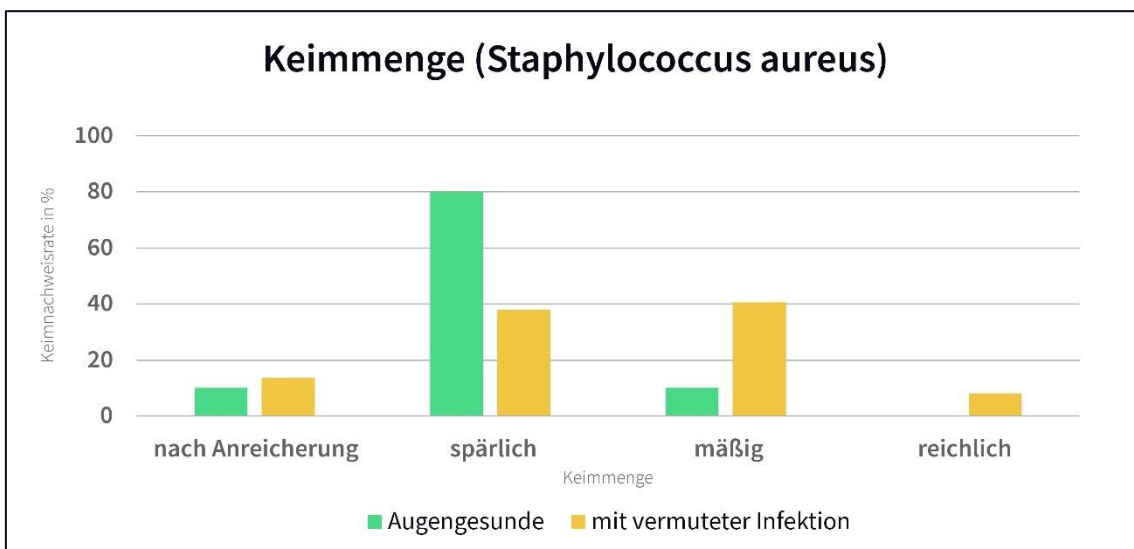


Abbildung 17: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung von *Staphylococcus aureus*

Streptokokken lagen bei vermuteter Infektion in 2 (15%) von 13 Fällen nach Anreicherung, in 4 (31%) spärlich, in 7 (54%) mäßig und in keinem Fall reichlich vor. Da sie in Bindehautabstrichen bei Augengesunden nicht zu finden waren, war eine Analyse im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test nicht möglich.

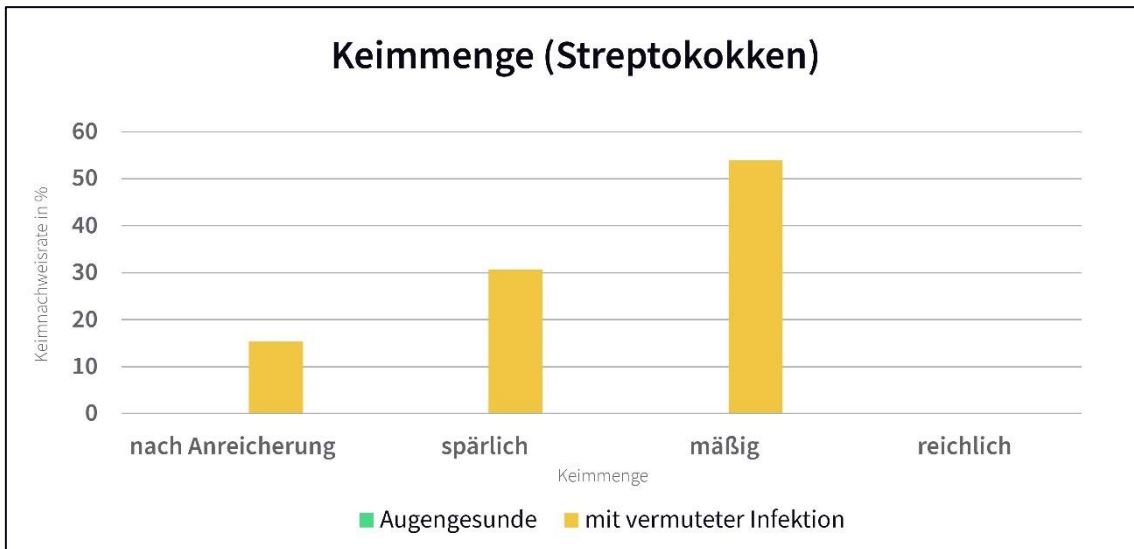


Abbildung 18: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung der Streptokokken

Coryne- und Propionibakterien waren nur in 1 Fall bei Augengesunden nachweisbar, hier lagen sie spärlich vor. Bei vermuteter Infektion lagen sie in 1 (14%) von 7 Fällen nach Anreicherung und in 6 (86%) Fällen spärlich vor. In mäßiger oder reichlicher Menge waren sie nicht vorzufinden. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergab sich keine Signifikanz ($p=1,000$)

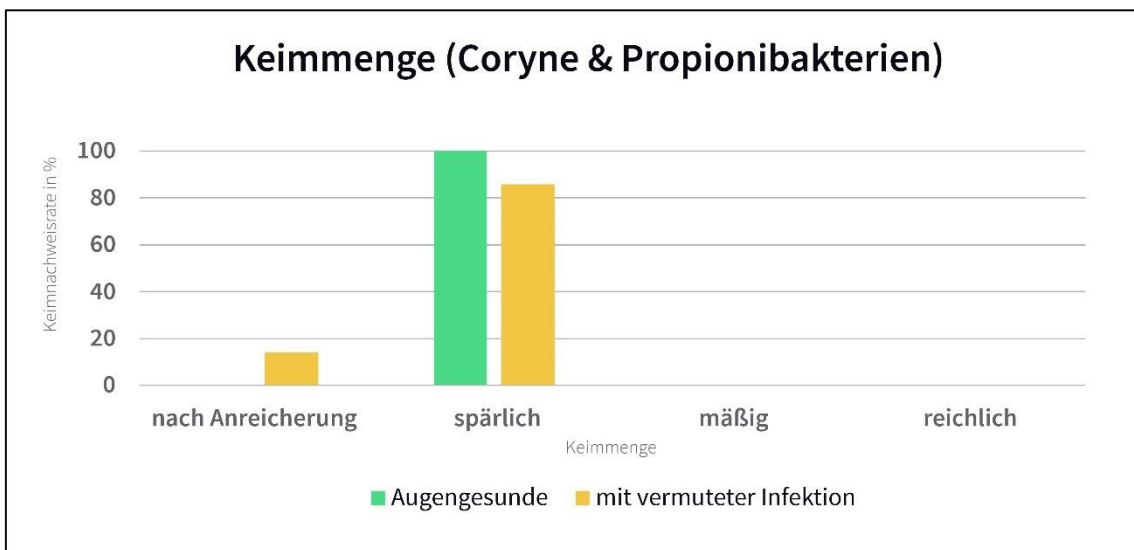


Abbildung 19: Darstellung der Keimmenge unter Berücksichtigung der Coryne- und Propionibakterien

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der Keimmenge, sowie die Ergebnisse des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests

		Alle	Koagulase- negative Staphylo- kokken	<i>Staphylococcus aureus</i>	Strepto- kokken	Coryne- & Propioni- bakterien
p		0,01	0,8	0,04	X	1
reichlich	Infektion	2,3	1,3	8,1	0	0
	gesund	0	0	0	0	0
mäßig	Infektion	21	3,8	41	54	0
	gesund	5,1	4,7	10	0	0
spärlich	Infektion	54	65	38	31	86
	gesund	75	73	80	0	100
nach Anreiche- rung	Infektion	21	30	14	15	14
	gesund	20	22	10	0	0

Angabe der Keimmenge in Prozent; p-Werte aus dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

7 Diskussion

In dieser Arbeit wurden mikrobiologische Proben der Augenoberfläche untersucht. Hierbei wurden Proben von Proband:innen mit gesunder Augenoberfläche und Patient:innen mit vermuteter Infektion der Augenoberfläche verglichen. Die Grundannahme war, dass sich die Standortflora sowohl bei Gesunden als auch, neben den die Krankheit bedingenden Erregern, bei Erkrankten finden lässt.

Ziel der Studie war die Interpretation von mikrobiologischen Befunden zu erleichtern. Hierzu wurden Aspekte eines mikrobiologischen Befunds gesucht, die es plausibler machen, dass es sich um einen pathogenen Erreger der Augeninfektion (und nicht um einen apathogenen Keim der Standortflora) handelt.

Untersucht wurde hierzu einerseits die Keimnachweisrate, d.h., ob Keime angezüchtet werden konnten oder nicht. Andererseits die Keimdifferenzierung, d.h. welche Keime angezüchtet werden konnten. Zusätzlich ermittelten wir die Keimmenge, d.h. wie viele koloniebildende Einheiten nachgewiesen wurden.

Hintergrund ist die schwierige Beurteilbarkeit mikrobiologischer Befunde bei Keratitiden und Konjunktivitiden bei gleichzeitig hoher Relevanz der Ergebnisse. Die schwierige Beurteilbarkeit ergibt sich unter anderem aus einer hohen Zahl an Proben, die ohne Erregernachweis bleiben, bzw. nur den Nachweis fraglich apathogener oder niederpathogener Keime erbrachten (49). Die klinische Relevanz zeigt sich bei Betrachtung möglicher Folgen von Infektionen der Augenoberfläche, insbesondere der Keratitiden. Hierzu zählen zum Beispiel Descemetocelen, Perforationen, Sekundärglaukome (58) welche bis zur Erblindung führen können (20, 22, 51), aber auch die Förderung von Resistenzbildung bei Anwendung ineffektiver Antibiotika (34, 42).

Diese Studie soll daher einen Baustein zur besseren Beurteilung und folglich effektiveren Therapie von Infektionen der Augenoberfläche bilden und so zur Prävention schwerwiegender Komplikationen beitragen.

7.1 Keimnachweisrate

Hinsichtlich der Keimnachweisrate konnten wir zeigen, dass unabhängig von der Lokalisation des Abstrichs bei Augengesunden häufiger Keime nachweisbar sind (je ca. 80%), als bei Patienten mit vermuteter Infektion (je ca. 60%).

Es scheint zunächst paradox, dass bei Augengesunden häufiger Keime nachgewiesen werden konnten, als bei vermutlich infizierten Augen. Als entscheidender Aspekt hierfür erscheint, dass ein großer Anteil (45-52%) der Abstriche erst nach Einleitung einer antibiotischen Therapie durchgeführt wurde. Bei dieser zuvor durchgeführten Therapie handelte es sich, wie in der Leitlinie der DOG und des BVA (15) empfohlen, gehäuft um Präparate mit breitem Spektrum. Hierzu zählen beispielsweise Fluorchinolone wie Ofloxacin und Moxifloxacin, sowie Aminoglykoside wie Gentamicin und

Neomycin. Letzteres wurde häufig in Kombinationspräparaten mit weiteren Antibiotika wie Polymyxin B und Gramicidin verwendet. Insgesamt wurde bei etwa der Hälfte aller Abstriche bereits vor Erreichen unserer Klinik eine antibiotische Therapie eingeleitet (ca. 52% der Bindehautabstriche, ca. 45% der Hornhautabstriche). In den Untersuchungen unserer Studie differenzierten wir diesen Prozentsatz nicht weiter nach einzelnen Präparaten, sondern betrachteten stets die Gesamtheit verschieden vorbehandelter Proben.

Bei Patienten mit vermuteter Infektion führte die antibiotische Vorbehandlung zu einer Reduktion der Keimnachweisrate bei Bindehautabstrichen um etwa ein Viertel, bei Hornhautabstrichen um etwa 14%. Unter Ausschluss der Abstriche nach Vorbehandlung war zumindest für Bindehautabstriche kein signifikanter Unterschied in der Keimnachweisrate mehr zu ermitteln (bei gleichzeitig geringerer Fallzahl), wenngleich die Tendenz einer höheren Rate (ca. 6%) bei Augengesunden blieb. Bei Hornhautabstrichen zeigte sich weiterhin ein signifikanter Unterschied, nun allerdings mit geringerer Differenz der Nachweisraten im Vergleich zu den Augengesunden (ca. 13%).

Bei der Betrachtung der Hornhautabstriche kann eine artifizielle Verschiebung der Keimnachweisraten leider nicht sicher ausgeschlossen werden. Durch die unterschiedlichen Techniken der Probengewinnung (Kratzabstrich/Tupferabstrich) könnte sich die Materialmenge, die die Laborergebnisse beeinflusst, unterschiedlich sein.

Dennoch sind auch pathophysiologische Mechanismen ein zu berücksichtigender Aspekt. Hierzu zählt insbesondere die Initiierung von Abwehrmechanismen, z.B. mechanisches Auswaschen infolge einer infektionsbedingten vermehrten Tränenproduktion, oder der Hochregulierung der Sekretion von Lysozym und anderen antibakteriell wirksamen Substanzen, die spezifisch und unspezifisch gegen Bakterien wirken können, durch das Conjunktiva-assoziierte lymphatische Gewebe (56). Dies führt nicht ausschließlich zur Eradikation der infektionsauslösenden Erreger, sondern zeitgleich zur Reduktion der Normalflora.

7.2 Keimdifferenzierung

Durch unsere Untersuchungen können wir bestätigen, dass bei Augengesunden grampositive Kokken (90% bei Bindehaut-, bzw. 82% bei Hornhautabstrichen), im speziellen Koagulase-negative Staphylokokken (80% bei Bindehaut-, bzw. 75% bei Hornhautabstrichen), den größten Anteil der nachweisbaren Flora ausmachen.

Hierbei zeigte sich die von uns beschriebene Normalflora erheblich weniger vielfältig als sie es in der Literatur vorbeschrieben ist. Sowohl bei Bindehaut- als auch bei Hornhautabstrichen wurden fast ausschließlich Staphylokokken gefunden. Nur in wenigen Einzelfällen wurden andere Keime nachgewiesen. Zweitgrößte Fraktion waren gramnegative Stäbchen, die sich in etwa 3% der Hornhautabstriche von Augengesunden nachweisen ließen (*Morganella morganii*, *Escherichia coli* und *Proteus mirabilis* jeweils einmal). Hierbei bleibt fraglich, ob diese Keime tatsächlich dauerhafter

Bestandteil der okularen Standortflora sind, oder nur temporär infolge von Schmierübertragungen nachweisbar waren.

Zwar wird auch in der Literatur beschrieben, dass Staphylokokken, insbesondere Koagulase-negative, den Großteil der nachweisbaren Flora ausmachen, doch auch andere Keime wie Streptokokken, Coryne- und Propionibakterien, sowie Mikrokokken werden häufig als Teil der okularen Normalflora beschrieben (50, 52, 57).

Ein möglicher Grund für die geringere Vielfalt sind lokale bzw. globale Unterschiede. Zwar sind hierzu bisher keine detaillierten Untersuchungen auffindbar, jedoch weist eine Arbeit von Grzybowski (24) auf die Unterschiede hin. Unabhängig von der Region zeigen sich Koagulase-negative-Staphylokokken als größte Fraktion (10, 11, 23, 43, 45, 48, 52, 62). Corynebakterien werden jedoch insbesondere in einer Arbeit aus Japan (62), gramnegative Bakterien und Pilze insbesondere in einer Arbeit aus Sierra Leone (10) als Teil der Normalflora beschrieben. Ferner wurden andere grampositive Keime vermehrt in Regionen wie Brasilien und Sierra Leone beschrieben (10, 24).

Hinzu kommt, dass unsere Proben für Augengesunde ab Ende Mai, vor Allem aber zwischen Juli und September gesammelt wurden, sodass saisonale Unterschiede gegebenenfalls nicht detektiert werden konnten. Zuvor konnte gezeigt werden, dass klimatische Veränderungen im Jahresverlauf Keimnachweisraten beeinflussen. In den Frühlingsmonaten April bis Juni fällt die generelle Nachweisrate höher aus als im Rest des Jahres. Aber auch für einzelne Keime sind saisonale Schwankungen zu beobachten, sodass beispielsweise *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* Spitzen in einzelnen Monaten zeigten (57).

Als weiterer Faktor, der Keimnachweisraten verringern kann, wird regelmäßige Tropfenapplikation beschrieben (29). Diese führt laut Suto et al. selbst bei Patienten, die unter dem Syndrom des trockenen Auges leiden zu reduzierten Keimnachweisraten (62). Häufiger wird das Syndrom des trockenen Auges jedoch in Zusammenhang mit einer erhöhten Keimnachweisrate, sowie größeren Diversität der nachgewiesenen Keime beschrieben (23, 33). Einige zusätzliche Faktoren, die Einfluss auf Keimnachweisraten haben, sind Diabetes mellitus (45) und Alkoholismus (25), die im Zusammenhang mit einem Anstieg der Nachweisraten von *Staphylococcus aureus* gesehen werden, sowie Morbus Behçet, bei dem zusätzlich auch höhere Nachweisraten für Moraxellen und Streptokokken auftraten (26). Alter, Körpergewicht, der Hormonstatus von Frauen, sowie der Augeninnendruck scheinen keinen Einfluss auf die Keimbesiedlung der Augenoberfläche zu haben (3).

Auch technische Aspekte kommen in Frage unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen Arbeiten zu bedingen. Neben den Staphylokokken sind vor allem Corynebakterien, aber auch Mikrokokken gleichzeitig als Teil der Normalflora der Haut beschrieben (13). Aufgrund der anatomischen Nähe zwischen Konjunktiva und Lidhaut ist denkbar, dass diese Keime akzidenziell in den Beschreibungen der konjunktivalen Flora auftauchen, jedoch eher Zeichen einer Überlagerung der konjunktivalen Flora durch die Hautflora sind. Verstärkt werden könnte dieser Effekt auch durch mangelnde

Compliance der Proband:innen, beispielsweise durch Blepharospasmus. Infolgedessen wären lokale Unterschiede der Hautflora, sowie die Abstrichtechnik und die Compliance der Proband:innen Faktoren, die die Vielseitigkeit der konjunktivalen Flora beeinflussen könnten. Zusätzlich unterscheidet sich die lokale Infrastruktur, sodass Rahmenbedingungen, die insbesondere bei kleinen Probenmengen relevant sind, wie die Transportzeit bis in das Labor, variieren und Ergebnisse beeinflussen können (27).

Wie eingangs beschrieben zählen zu den „klassischen“ Keratitiserregern, bzw. denjenigen Keimen, die klassischerweise bei Keratitiden nachgewiesen werden, vor allem Koagulase-negative Staphylokokken und *Pseudomonas aeruginosa*, aber auch *Staphylococcus aureus*, Streptokokken, Corynebakterien und Moraxellen (49). Auch in unserer Arbeit zeigten sich Koagulase-negative Staphylokokken (30%) und *Staphylococcus aureus* (15%) als häufigste Vertreter bei Hornhautabstrichen. Die übrigen zu erwartenden Keime zeigten sich seltener (*Pseudomonas aeruginosa*: 4%, Streptokokken: 5%). Moraxellen und Corynebakterien zeigten sich nur in Einzelfällen, jedoch konnte *Propionibacterium acnes* in 5% der Fälle nachgewiesen werden.

Für bakterielle Konjunktivitiden gelten Koagulase-negative Staphylokokken und *Staphylococcus aureus*, sowie *Haemophilus influenzae*, Streptokokken, *Moraxella catarrhalis* und Enterobacterales als häufigste nachgewiesene Keime (2, 19, 31, 54). Wir konnten dies bezüglich Koagulase-negativer Staphylokokken (35%) und *Staphylococcus aureus* (17%) bestätigen. Auch hier zeigten sich andere klassische Keime seltener (Streptokokken 6%, *Haemophilus influenzae* 4%, Enterobacterales 4%, *Moraxella catarrhalis* 1%). Zusätzlich zeigte sich *Pseudomonas aeruginosa* in 3% der Fälle.

Im Vergleich der Gruppe der Augengesunden mit der mit vermuteter Infektion konnten wir zeigen, dass grampositive Kokken, im speziellen Koagulase-negative Staphylokokken, sowohl bei Augengesunden als auch bei Patienten mit vermuteter Infektion bei Bindehaut- und Hornhautabstrichen den größten Anteil der nachgewiesenen Keime ausmachten. Es zeigte sich jedoch, dass sie bei Augengesunden signifikant häufiger als bei Patienten mit vermuteter Infektion zu beobachten waren. Diese Beobachtung passt zur Annahme, dass grampositive Keime bei Infektion häufig koinzidenziell mit nachgewiesen werden, sodass eine klare Zuordnung als Infektionserreger nur schwer möglich ist.

Für Hornhautabstriche können wir festhalten, dass nach detaillierter Betrachtung der grampositiven Kokken *Staphylococcus aureus* und Streptokokken signifikant eher bei vermuteter Infektion gefunden werden konnten und dass unter anderen grampositiven Keimen insbesondere Coryne- und Propionibakterien eher bei vermuteter Infektion auftraten. Hierbei ist zu betonen, dass grampositive Stäbchen und Pleomorphe bei Augengesunden nicht gefunden wurden. In der Betrachtung aller gramnegativer Kokken, die insgesamt nur sehr selten (4 Fälle bei vermuteter Infektion) vorkamen, und gramnegativer Stäbchen konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen Augengesunden und Patienten mit vermuteter Infektion beschreiben. Bei isolierter Betrachtung des *Pseudomonas*

aeruginosa viel auf, dass auch dieser lediglich bei vermuteter Infektion nachweisbar war. Trotz der geringen Fallzahl ergab sich hierbei eine statistische Signifikanz.

Für Bindehautabstriche gilt, dass gramnegative Stäbchen, aber auch Streptokokken signifikant häufiger bei vermuteter Infektion auftraten – diese beiden Gruppen waren in unserer Studie in Bindehautabstrichen bei Gesunden überhaupt nicht zu finden.

Alle weiteren in Hinblick auf Nachweisraten untersuchten Aspekte blieben ohne Signifikanz. Hiervon sind insbesondere der Nachweis von Pilzen in Bindehaut- und Hornhautabstrichen hervorzuheben, aber auch der Nachweis gramnegativer-Stäbchen in Hornhautabstrichen, sowie der Nachweis von *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* in Bindehautabstrichen. Hier ist jedoch die geringe Fallzahl zu betonen, die statistische Auswertungen erschwert.

Unsere Daten über die oben beschriebenen am häufigsten nachgewiesenen Keime bei Infektionen der Augenoberfläche reihen sich in die bestehende Literatur ein und stimmen in wesentlichen Punkten mit ihr überein. Hierzu gehört neben den oben genannten insbesondere der große Anteil an Staphylokokken. Weiterhin bleibt aber fraglich, ob diese tatsächlich reale Pathogene sind, oder ob es sich hierbei um eine Mitanzucht der Normalflora handelt.

7.3 Keimmenge

In Hinblick auf die Keimmenge konnten Analysen lediglich für Bindehautabstriche durchgeführt werden. Dies liegt darin begründet, dass im klinischen Alltag Proben aus Hornhautabstrichen in einer Hirn-Herz Boullion in das Labor transportiert werden, um die Sensitivität zu verbessern. Diese fungiert im Gegensatz zum Transportmedium bei Bindehautabstrichen nicht nur der Konservierung der Keime sondern auch als Anzuchtmedium, sodass eine Quantifizierung mittels Dreiösenausstrich nicht möglich war.

In der Analyse der Bindehautabstriche fiel auf, dass unter Berücksichtigung aller nachgewiesenen Keime die Keimmenge bei vermuteter Infektion signifikant größer war als bei Augengesunden. In detaillierten Untersuchungen für einzelne Keime und Klassen zeigte sich ausschließlich für *Staphylococcus aureus* eine Signifikanz im Sinne einer höheren Keimmenge bei vermuteter Infektion. Für alle anderen untersuchten Keime konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

Trotz des Nachweises einer Signifikanz ist die Beurteilung, ob die Keimmenge ein klarer Indikator für die Pathogenität ist, schwierig. Die Beobachtungen zeigen, dass die Keimmenge einerseits ein Parameter ist, der im klinischen Alltag zur Bewertung mikrobiologischer Befunde hinzugezogen werden kann. Dies basiert auf der Beobachtung, dass unter Betrachtung von *Staphylococcus aureus*, oder aller nachgewiesenen Keime größere Keimmengen häufiger bei vermuteter Infektion auftreten und dass diese Beobachtung statistisch signifikant ist. Andererseits sind auch bei vermuteter Infektion geringe Keimmengen häufig vertreten. *Staphylococcus aureus* liegt beispielsweise neben 90% bei

Augengesunden (nach Anreicherung 10%; spärlich: 80%) auch bei vermuteter Infektion in 52% der Fälle in geringen Keimmengen vor (nach Anreicherung 14%; spärlich: 38%).

7.4 Bedeutung für den klinischen Alltag

Aufgrund der möglichen schwerwiegenden Komplikationen von Infektionen der Augenoberfläche liegt die klinische Relevanz der mikrobiologischen Diagnostik darin, eine optimale antibiotische Therapie wählen zu können. Diese Wahl kann insbesondere beim Nachweis von Keimen schwierig sein, die sowohl der Normalflora als auch den klassischen Pathogenen zugeordnet werden. Wie eingangs erwähnt postulierte bereits Robert Koch die Wichtigkeit zwischen Keimen, die während einer Infektion nachgewiesen wurden, und tatsächlich infektionsbedingenden Keimen zu unterscheiden (37, 44). Heute gilt es herauszufinden mithilfe welcher zusätzlichen Parameter Ergebnisse von Abstrichen der Augenoberfläche sicherer bewertet werden können, d.h. bewerten zu können, ob ein Keim der Normalflora als Artefakt in einem mikrobiologischen Befund erscheint, ohne dass der tatsächlich pathogene Keim identifiziert wurde. Hierzu ist in erster Linie eine statistische Betrachtung der Keimbesiedlung der Augenoberfläche bei gesunden und entzündeten Augen von Nutzen. Denn bei Nachweis von Keimen, die nicht als Teil der Normalflora beschrieben sind, ist eher davon auszugehen, dass sie die Ursache der Infektion sind. Aufgrund der Schnittmenge zwischen Normalflora und pathogenen Keimen sind jedoch weitere Parameter nötig, um die Beurteilung zu erleichtern. Einer dieser Parameter scheint die Keimmenge zu sein. Zwar ließ sich in unserer Studie ein signifikanter Unterschied zwischen der Keimmenge innerhalb der Normalflora und derjenigen bei vermuteter Infektion zunächst nur für *Staphylococcus aureus* bestätigen, doch ergab sich auch in der Gesamtheit aller gefundenen Keime eine Signifikanz bzgl. der Keimmenge. Nichtsdestotrotz sollte sie hierbei nicht der einzige Indikator sein. Denn auch wenn die Keimmenge bei Infektionen tendenziell größer ist, bleibt in unserem Fall festzuhalten, dass ein großer Anteil der Keime auch auf infizierten Augen in nur kleinen Mengen nachgewiesen werden konnten (75% nach Anreicherung oder spärlich).

Weiterhin ist der Nachweis einiger Keime, die eher der Normalflora zugehörig scheinen, in Abstrichen vermutlich infizierter Augen nicht zu vernachlässigen. Viele Keime, darunter diejenigen, die wir eher als Teil der Normalflora identifizieren konnten, sind allein nicht in der Lage Epithelien zu durchwandern (39, 63). Im Fall einer Infektion mit einem Erreger, der eine Durchtrittspforte durch das Epithel bildet, oder einer anderweitigen, beispielsweise mechanischen Schädigung der Barriere, können auch sonst harmlose Keime wie Koagulase-negative Staphylokokken Infektionen unterhalten (1). Es kann zu Mischinfektionen kommen, sodass im klinischen Verlauf, insbesondere bei therapierefraktären Befunden stets reevaluiert werden sollte, ob bei Nachweis nur eines Keims gegebenenfalls eine Mischinfektion übersehen wurde. In diesem Zusammenhang sind Regionen hervorzuheben, in denen die Normalflora diverser zu sein scheint und aus unserer Sicht eher pathogene Keime miteinschließt. In Sierra Leone wird in 6% der Abstriche bei Gesunden *Pseudomonas aeruginosa*, sowie in 9% *Aspergillus sp.* nachgewiesen (10). In Japan werden in 27% der Abstriche

Corynebacterium sp. nachgewiesen (62). In ähnlicher Weise spielt die lokale antibiotische Therapie mit Augentropfen bei Endophthalmitiden eine Rolle. In diesem Fall ist nach Keimidentifizierung häufig eine Anpassung der systemischen Antibiose im Sinne eines schmaleren Wirkspektrums zu Gunsten besserer Gewebegängigkeit von Nöten. Die antibiotische Therapie der Augenoberfläche kann in diesem Fall prophylaktisch breit gehalten werden, um z.B. bei Durchwanderungskeratitiden oder anderen potenziellen Eintrittspforten eine sekundäre Mischinfektion aus Keimen der Normalflora zu vermeiden. Dies spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn die Normalflora als sehr divers beschrieben ist.

7.4.1 Exkurs: klinische Befunde zur Evaluation von Erregern

Aufgrund der kulturellen Anzucht dauert es meist einige Tage bis zum Erhalt der mikrobiologischen Ergebnisse. Daher ist die Einleitung einer empirischen Therapie zunächst unabdingbar. Hierzu ist einerseits zu beachten, welche Keime unter Berücksichtigung der stets mitkultivierten Normalflora statistisch am häufigsten Konjunktivitiden und Keratitiden auslösen. Andererseits gibt es unter den Infektionszeichen typische morphologische Erscheinungsbilder, die durch verschiedene Erreger hervorgerufen werden:

- systemische Symptome, initial beispielsweise allgemeines Schwächegefühl oder Fieber, bei Konjunktivitiden, die durch *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Chlamydia* und/oder *Haemophilus influenzae* hervorgerufen werden (7),
- Erytheme und Lidödeme neben anderen insbesondere bei Konjunktivitiden durch *Neisseria gonorrhoeae* (7),
- Konjunktivitiden mit peripheren Hornhautulzerationen durch *Neisseria gonorrhoeae* oder *meningitidis* (7),
- starker Schmerz, der mit gelb-grünlichem purulentem Exsudat, rascher Stromaausdünnung und Descemetocèle einhergeht, bei *Pseudomonas*-Infektion (18),
- Ringabszesse mit flächigen Einschmelzungen bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* (39),
- runde Ulzerationen, die auf das Areal eines Epitheldefekts begrenzt sind mit nur minimaler ödematöser Beteiligung des umliegenden Stromas bei staphylokokkenbedingten Keratitiden (18),
- wenig schmerzhaft Verläufe mit langsamer Progression bei Staphylokokken (39),
- geschlängelte Ulzerationen, die sich über Cornea erstrecken bei Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* (18),
- schnelles Durchwandern des Stromas mit konsekutiv früher intraokularer Beteiligung und starkem Schmerz bei Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* (39),
- schmerzfreier Verlauf mit nur langsamer Progredienz und eher ovaler, inferior gelegener Ulzeration bei Infektion mit Moraxellen (39).

Anhand dieser Hinweise kann eine entsprechende erste antibiotische Therapie gewählt werden, die im Verlauf mit Erhalt der mikrobiologischen Ergebnisse und unter Betrachtung der Gesamtheit aller gesammelten Informationen gegebenenfalls angepasst werden kann. Hierbei sollte im Vorfeld der Deeskalation der antibiotischen Therapie die Validität des mikrobiologischen Befundes kritisch hinterfragt werden.

7.5 Zusammenfassung & Ausblick

Unsere Arbeit konnte einige Aspekte zeigen, welche bei der Interpretation mikrobiologischer Befunde hilfreich sein können.

Einen Parameter oder eine Kombination von Parametern zur sicheren Unterscheidung zwischen einer apathogenen Normalflora und einem pathogenen Erreger einer Konjunktivitis oder Keratitis konnten wir nicht identifizieren. Dies war jedoch auch nicht zu erwarten, da die Schnittmenge an Keimen, die sowohl bei vielen Augengesunden, aber auch bei vermuteter Infektion gefunden werden, groß ist. Hierzu gehören insbesondere Koagulase-negative Staphylokokken. Da aber nicht sicher auszuschließen ist, dass diese Keime, beispielsweise durch traumatische Verschleppung, im Hornhautstroma eine Keratitis hervorrufen können, kommt der klinischen Beurteilung des Befundes bei der Behandlung eine wichtige Rolle zu.

In der Tendenz konnten wir aber einige Aspekte identifizieren, welche bei der Befundbeurteilung hilfreich sein können:

- Zu den wichtigsten Aspekten zählen die höhere generelle Keimnachweisrate bei Augengesunden, aber auch das signifikant häufigere Vorkommen von grampositiven Kokken, mit Ausnahme von *Staphylococcus aureus*, bei Augengesunden. Somit ist der Nachweis dieser Keime unabhängig von einer Erkrankung zu erwarten und muss bei isolierter Betrachtung der mikrobiologischen Befunde eher nicht einer Erkrankung zugeordnet werden.
- Bei Hornhautabstrichen zeigten sich unter den grampositiven Kokken *Staphylococcus aureus* und Streptokokken, im Gegensatz zu Koagulase-negativen Staphylokokken, signifikant häufiger bei vermuteter Infektion. Auch Coryne- und Propionibakterien, sowie *Pseudomonas aeruginosa* zeigten sich in unserer Arbeit eher bei vermuteter Infektion. Bei Bindehautabstrichen zeigten sich gramnegative Stäbchen und Streptokokken signifikant häufiger bei vermuteter Infektion. Diese Daten helfen, um bei passendem klinischem Befund die Therapie den mikrobiologischen Ergebnissen entsprechend einzuleiten bzw. zu reevaluieren. Unabhängig von unseren Ergebnissen ist insbesondere bei hochpathogenen und selten nachgewiesenen Erregern wie *Neisseria gonorrhoeae* oder *Chlamydia trachomatis* aber allein schon der mikrobiologische Befund wegweisend.
- Unter Betrachtung aller nachgewiesener Keime waren größere Keimmengen bei vermuteter Infektion, insbesondere bei *Staphylococcus aureus*, zu verzeichnen. Der reichliche Nachweis eines Keimes ist daher ein Faktor, der für eine Behandlung des entsprechenden Keims spricht.

Wir können in unserer Arbeit nicht ausschließen, dass die von uns bestimmte Normalflora durch einen Selektionsbias verzerrt wurde, da die meisten unserer Proben in einem Zeitraum von 3 Monaten genommen wurden (Juli bis September). Die Proben der Erkrankten wurden dem entgegen über das ganze Jahr eingeschlossen. Aufgrund der zuvor geschilderten saisonalen Unterschiede ist eine gleichmäßige Verteilung über mindestens ein Jahr bzw. mehrfache Probennahme der Probanden im Jahresverlauf anzustreben, um nicht nur generelle Hinweise zur Beurteilung der mikrobiologischen Befunde zu erstellen, sondern auch jahreszeitspezifische Merkmale festzuhalten.

Vorbeschriebene Einflussfaktoren auf die Keimbesiedlung der Augenoberfläche (Tropfenapplikation, trockenes Auge, Diabetes Mellitus, Alkoholismus, etc.) wurden bei uns nicht erfasst und könnten ebenfalls zu einem Bias führen. Dies sollte bei zukünftigen Projekten miterfasst werden.

Für die Beurteilung wäre zusätzlich ein größeres Patientenkollektiv, vor allem zur Evaluierung der Rolle von Keimen, die nur sehr selten nachgewiesen werden können, hilfreich. In unserem Fall konnten zu einigen Keimen keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Dies führen wir insbesondere bei als pathogen vorbeschriebenen Erregern am ehesten auf die insgesamt niedrigen Nachweisraten zurück. Diese Problematik zeigt sich auch in der Analyse der Keimmengen. Mit unseren Keimmengenanalysen konnten wir dennoch zeigen, dass sie zur Beurteilung der Befunde beitragen kann. Um hierzu in Zukunft sicherere Aussagen treffen zu können, sind größere Datenmengen von Nöten. Es kann zum Beispiel eine multizentrische Studie geplant werden. Sofern diese prospektiv geplant wird, kann zusätzlich eine zeitliche Differenz der beiden Gruppen vermieden werden. Hierbei ist allerdings unbedingt auf eine einheitliche Methodik zu achten, da Proben-transportmedium, Transportzeit und Durchführung der Keimanzucht einen Einfluss auf die nachgewiesenen Keime haben. In unserem Fall sind alle Proben in vergleichbarer Zeit in dasselbe Labor und dort nach denselben Standards analysiert worden, sodass Messchwankungen durch Unterschiede in der Analytik sehr unwahrscheinlich sind.

Die Daten aus der Vergangenheit zeigen, dass eine große Schnittmenge zwischen Keimen, die häufig bei gesunden Augenoberflächen und denjenigen, die häufig bei Keratitiden und/oder Konjunktivitiden nachweisbar sind, besteht. Es ist davon auszugehen, dass nicht jeder dieser Keime den Kochschen Postulaten entspricht. Die Interpretation mikrobiologischer Befunde bei Infektionen der Augenoberfläche kann daher im Einzelfall komplex sein. Auf der Grundlage unserer Arbeit sind wir optimistisch einige der Punkte darstellen zu können, welche bei dieser Beurteilung helfen.

8 Zusammenfassung

Hintergrund:

Infektionen der Augenoberfläche können schwerwiegende Komplikationen mit sich bringen. Hierzu gehören Descemetocelen, Perforationen oder das Sekundärglaukom bis hin zur Erblindung.

Aufgrund dessen ist eine adäquate Therapie unverzichtbar. Die Beurteilung mikrobiologischer Befunde in der Augenheilkunde ist oft nicht einfach, denn einerseits existiert eine Normalflora und andererseits sind die detektierten Keimmengen sehr gering. Daher ist die Beurteilung, ob ein nachgewiesener Keim tatsächlich kausal mit der Infektion zusammenhängt, oder aber der Normalflora entspringt oft nicht klar. In der Folge ist die Wahl eines Antibiotikums nach Resistenztestung nicht immer möglich. In unserer Arbeit geht es daher darum, Parameter zu finden, die der besseren Beurteilbarkeit mikrobiologischer Befunde in der Augenheilkunde dienen können.

Material und Methoden:

Wir verglichen mikrobiologische Ergebnisse aus Abstrichen von Patient:innen mit vermuteter Infektion zwischen Januar 2016 und September 2020 mit Daten aus Abstrichen von Proband:innen ohne Infektion der Augenoberfläche aus den Monaten Mai bis September 2020. Beurteilt wurden die generelle Keimnachweisrate, Keimnachweisraten der einzelnen Keime, sowie die Keimmenge. In den Analysen wurde jeweils in eine Gruppe mit vermuteter Infektion und eine Gruppe der Augengesunden, sowie in Bindehaut- und Hornhautabstriche unterteilt. Mithilfe des exakten χ^2 -Test nach R.A. Fisher wurde bestimmt auf welchem Signifikanzniveau Keime eher bei vermuteter Infektion bzw. bei Augengesunden auftraten. Ob ein signifikanter Unterschied in der Keimmenge zwischen den beiden Gruppen vorlag, ermittelten wir mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests.

Ergebnisse:

Insgesamt wurden 713 Abstriche analysiert. Hierunter waren 106 Bindehautabstriche von Augengesunden und 222 Bindehautabstriche bei vermuteter Infektion, sowie 108 Hornhautabstriche von Augengesunden und 277 Hornhautabstriche bei vermuteter Infektion. Hinsichtlich der Keimnachweisraten zeigte sich bei Bindehaut- ($p < 0,001$) und Hornhautabstrichen ($p < 0,001$) eine signifikant höhere Rate bei Augengesunden. Nach Ausschluss der Abstriche nach antibiotischer Vorbehandlung konnte für Bindehautabstriche kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p = 0,3$), für Hornhautabstriche jedoch schon ($p = 0,03$). Bei Bindehautabstrichen traten grampositive Kokken ($p < 0,001$) signifikant häufiger bei Augengesunden, gramnegative Stäbchen ($p < 0,001$) signifikant häufiger bei vermuteter Infektion auf. Für grampositive Stäbchen und Pleomorphe ($p = 0,07$) gramnegative Kokken ($p = 1$) und Pilze ($p = 0,5$) konnte, bei insgesamt jedoch geringer Fallzahl, keine Signifikanz gezeigt werden. Bei Hornhautabstrichen traten grampositive Kokken ($p < 0,001$) ebenfalls signifikant häufiger bei Augengesunden, grampositive Stäbchen und Pleomorphe ($p = 0,002$) signifikant häufiger bei vermuteter Infektion auf. Für gramnegative Stäbchen ($p = 0,07$) gramnegative Kokken ($p = 0,6$) und Pilze ($p = 1$) konnte, bei ebenfalls geringer Fallzahl, keine Signifikanz gezeigt werden. In den Analysen einzelner Keime bzw. Klassen zeigte sich für Bindehautabstriche ein signifikant häufigeres Vorkommen von Koagulase-negativen Staphylokokken ($p < 0,001$) bei Augengesunden, sowie von Streptokokken ($p = 0,006$) bei vermuteter Infektion. Für *Staphylococcus aureus* ($p = 0,09$), Coryne- und Propionibakterien ($p = 0,4$) und *Haemophilus influenzae*

($p=0,06$) zeigten sich keine Signifikanzen. Bei Hornhautabstrichen lagen Koagulase-negativen Staphylokokken ($p<0,001$) signifikant häufiger bei Augengesunden vor. *Staphylococcus aureus* ($p=0,005$), Streptokokken ($p=0,05$), Coryne- und Propionibakterien ($p=0,008$) und *Pseudomonas aeruginosa* ($p=0,02$) lagen signifikant häufiger bei vermuteter Infektion vor. Hinsichtlich der Keimmenge zeigte sich unter Berücksichtigung aller Keime ($p=0,01$), sowie bei *Staphylococcus aureus* ($p=0,04$) eine signifikant höhere Keimmenge bei vermuteter Infektion. Für Koagulase-negative Staphylokokken ($p=0,8$), Streptokokken und Coryne- und Propionibakterien ($p=1$) war keine Signifikanz darstellbar.

Schlussfolgerungen:

Einen Parameter oder eine Kombination von Parametern zur sicheren Unterscheidung zwischen einer apathogenen Normalflora und einem pathogenen Erreger einer Konjunktivitis oder Keratitis konnten wir nicht identifizieren. Wir konnten jedoch zeigen, dass einige Keime eher mit der natürlichen Flora oder mit Infektionen assoziiert sind und dass die Keimmenge ein möglicher Indikator zur besseren Beurteilbarkeit in Grenzfällen sein könnte.

9 Summary

Background:

Ocular surface infections can cause serious complications. These include descemetocelles, perforations or secondary glaucoma up to blindness. Because of this, adequate therapy is essential. Unfortunately, the evaluation of microbiological findings in ophthalmology is often not easy, because on the one hand a normal flora exists and on the other hand the detected amounts of pathogens are very low. Therefore, the assessment whether a detected bacterium or fungus is actually causally related to the infection or originates from the normal flora is often not clear. As a consequence, the selection of an antibiotic based on resistance testing is not always possible. Therefore, our work's aim was to find parameters that can serve to improve the assessability of microbiological findings in ophthalmology.

Material and Methods:

We compared microbiological results from swabs of patients with presumed infection from 2016 to 2020 with data from swabs of patients without infection of the ocular surface from May to September 2020. The general germ detection rate, germ detection rates of individual germs, as well as the amount of germs were evaluated. In the analyses, each were divided into a group with presumed infection and a group of healthy eyes, as well as into conjunctival and corneal swabs. R.A. Fisher's exact χ^2 -test was used to determine the significance level at which germs were more likely to occur in presumed infection or in healthy subjects. We determined whether there was a significant difference in the amount of germs between the two groups using the Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Results:

A total of 713 smears were analyzed. These included 106 conjunctival swabs from healthy eyes and 222 conjunctival swabs from eyes with presumed infection, and 108 corneal swabs from healthy eyes and 277 corneal swabs from eyes with presumed infection. Regarding the germ detection rates, conjunctival ($p < 0.001$) and corneal ($p < 0.001$) smears showed a significant higher rate in ocular healthy subjects. After exclusion of smears that were made after antibiotic pretreatment, no significant difference was found for conjunctival smears ($p = 0.3$), but for corneal smears it was ($p = 0.03$). For conjunctival swabs, gram-positive cocci ($p < 0.001$) were significantly more frequent in ocular healthy patients, gram-negative rods ($p < 0.001$) were significantly more frequent in presumed infection. No significance was shown for gram-positive rods and pleomorphs ($p = 0.07$), gram-negative cocci ($p = 1$) and fungi ($p = 0.5$). For corneal smears, gram-positive cocci ($p < 0.001$) also occurred significantly more often in ocular healthy individuals, gram-positive rods and pleomorphs ($p = 0.002$) significantly more often in eyes with presumed infection. No significance was shown for gram-negative rods ($p = 0.07$), gram-negative cocci ($p = 0.6$) and fungi ($p = 1$). In the analyses of individual germs or classes, for conjunctival swabs there was a significantly more frequent occurrence of coagulase-negative

staphylococci ($p < 0.001$) in ocular healthy individuals and of streptococci ($p = 0.006$) in eyes with presumed infection. For *Staphylococcus aureus* ($p = 0.09$), coryne- and propionibacteria ($p = 0.4$) and *Haemophilus influenzae* ($p = 0.06$) there were no significances. In corneal smears, coagulase-negative staphylococci ($p < 0.001$) were significantly more abundant in ocular healthy subjects. *Staphylococcus aureus* ($p = 0.005$), streptococci ($p = 0.05$), coryne- and propionibacteria ($p = 0.008$) and *Pseudomonas aeruginosa* ($p = 0.02$) were significantly more frequent in presumed infections. Regarding the amount of germs, considering all germs ($p = 0.01$), as well as *Staphylococcus aureus* ($p = 0.04$) showed a significantly higher amount of germs in presumed infection. For coagulase-negative staphylococci ($p = 0.8$), streptococci and coryne- and propionibacteria ($p = 1$) no significance was presentable.

Conclusions:

We could not identify one parameter or a combination of parameters for reliable differentiation between an apathogenic normal flora and a pathogenic agent of conjunctivitis or keratitis. However, we could show that some germs are rather associated with the natural flora or with infections and that the amount of germs could be a possible indicator for a better assessability in borderline cases.

10 Literaturverzeichnis

1. Argemi X, Hansmann Y, Prola K, Prévost G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *Int J Mol Sci* 2019; 20(5). doi: 10.3390/ijms20051215.
2. Azari AA, Arabi A. Conjunctivitis: A Systematic Review. *J Ophthalmic Vis Res* 2020; 15(3):372–95. doi: 10.18502/jovr.v15i3.7456.
3. Balikoglu-Yilmaz M, Sen E, Sevket O, Polat Y, Karabulut A, Uysal O. Comparison of aerobic conjunctival bacterial flora in pregnant, reproductive-aged and postmenopausal women. *Int J Ophthalmol* 2012; 5(6):731–6. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.06.15.
4. Berchter M, Meister J, Hammes C. MALDI-TOF-MS: Eine neue analytische Technik zur Charakterisierung von Produkten auf Basis nachwachsender Rohstoffe. *Lipid / Fett* 1997; 99(11):384–91. doi: 10.1002/lipi.19970991103.
5. Beuerman RW, Pedroza L. Ultrastructure of the human cornea. *Microsc. Res. Tech.* 1996; 33(4):320–35. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19960301)33:4<320::AID-JEMT3>3.0.CO;2-T.
6. Bowling B. Das trockene Auge. In: KANSKI's Klinische Ophthalmologie: Ein systematischer Ansatz. 8. Aufl. München: Elsevier; 2017. S. 115–25.
7. Bowling B. Konjunktiva. In: KANSKI's Klinische Ophthalmologie: Ein systematischer Ansatz. 8. Aufl. München: Elsevier; 2017. S. 127–61.
8. Bowling B. Kornea. In: KANSKI's Klinische Ophthalmologie: Ein systematischer Ansatz. 8. Aufl. München: Elsevier; 2017. S. 163–233.
9. Burton MJ. Prevention, treatment and rehabilitation. *Community Eye Health* 2009; 22(71):33–5.
10. Capriotti JA, Pelletier JS, Shah M, Caivano DM, Ritterband DC. Normal ocular flora in healthy eyes from a rural population in Sierra Leone. *Int Ophthalmol* 2009; 29(2):81–4. doi: 10.1007/s10792-008-9196-4.
11. Caro JJ de, Ta CN, Ho H-KV, Cabaal L, Hu N, Sanislo SR et al. Bacterial contamination of ocular surface and needles in patients undergoing intravitreal injections. *Retina* 2008; 28(6):877–83. doi: 10.1097/IAE.0b013e31816b3180.
12. Dalmon C, Porco TC, Lietman TM, Prajna NV, Prajna L, Das MR et al. The clinical differentiation of bacterial and fungal keratitis: a photographic survey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(4):1787–91. doi: 10.1167/iovs.11-8478.
13. Davis CP. Chapter 6 Normal Flora. In: Baron S, Hrsg. *Medical microbiology*. 4. Aufl. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston Dept. of Microbiology & Immunology; 1996.

14. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft; Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. Leitlinie Nr. 12 Bakterielle Konjunktivitis; 2011 [Stand: 26.10.2020]. Verfügbar unter: <https://www.dog.org/wp-content/uploads/2009/09/Leitlinie-Nr.-12-Bakterielle-Konjunktivitis.pdf>.
15. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft; Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. Leitlinie Nr. 13 Keratitis; 2011 [Stand: 26.10.2020]. Verfügbar unter: <https://www.dog.org/wp-content/uploads/2009/09/Leitlinie-Nr.-13-Keratitis.pdf>.
16. Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, Bates B, Garoutte A, Miller D et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(8):5408–13. doi: 10.1167/iovs.10-6939.
17. Du Prel J-B, Röhrig B, Hommel G, Blettner M. Auswahl statistischer Testverfahren: Teil 12 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107(19):343–8. doi: 10.3238/arztebl.2010.0343.
18. Egrilmez S, Yildirim-Theveny Ş. Treatment-Resistant Bacterial Keratitis: Challenges and Solutions. *Clin Ophthalmol* 2020; 14:287–97. doi: 10.2147/OPTH.S181997.
19. Epling J. Bacterial conjunctivitis. *BMJ Clin Evid* 2012; 2012.
20. Finger RP, Bertram B, Wolfram C, Holz FG. Blindness and visual impairment in Germany: a slight fall in prevalence. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109(27-28):484–9. doi: 10.3238/arztebl.2012.0484.
21. Fisher RA. On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 1922; 85(1):87. doi: 10.2307/2340521.
22. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health* 2017; 5(12):e1221-e1234. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30393-5.
23. Graham JE, Moore JE, Jiru X, Moore JE, Goodall EA, Dooley JSG et al. Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(12):5616–23. doi: 10.1167/iovs.07-0588.
24. Grzybowski A, Brona P, Kim SJ. Microbial flora and resistance in ophthalmology: a review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017; 255(5):851–62. doi: 10.1007/s00417-017-3608-y.
25. Gunduz G, Gunduz A, Polat N, Cumurcu BE, Yakupogulları Y. The Effect of Chronic Alcoholism on the Conjunctival Flora. *Curr Eye Res* 2016; 41(6):734–9. doi: 10.3109/02713683.2015.1056805.

26. Gündüz A, Gündüz A, Cumurcu T, Seyrek A. Conjunctival flora in Behçet patients. *Can J Ophthalmol* 2008; 43(4):476–9. doi: 10.3129/i08-089.
27. Harrington SM. If Specimen Collection and Processing Guidelines Fall, Does Anyone Hear Them? Pre-Analytical Conundrums in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Newsletter* 2014; 36(14):105–14. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2014.07.001.
28. Hart DE, Hosmer M, Georgescu M, Farris RL. Bacterial assay of contact lens wearers. *Optom Vis Sci* 1996; 73(3):204–7. doi: 10.1097/00006324-199603000-00014.
29. Honda R, Toshida H, Suto C, Fujimaki T, Kimura T, Ohta T et al. Effect of long-term treatment with eyedrops for glaucoma on conjunctival bacterial flora. *Infect Drug Resist* 2011; 4:191–6. doi: 10.2147/IDR.S24250.
30. Hothorn T, Hornik K, van Wiel MA de, Zeileis A. Implementing a Class of Permutation Tests: The coin Package. *J. Stat. Soft.* 2008; 28(8). doi: 10.18637/jss.v028.i08.
31. Høvdning G. Acute bacterial conjunctivitis. *Acta Ophthalmol* 2008; 86(1):5–17. doi: 10.1111/j.1600-0420.2007.01006.x.
32. Huang Y, Yang B, Li W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(7):643.e7-643.e12. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.008.
33. Jiang X, Deng A, Yang J, Bai H, Yang Z, Wu J et al. Pathogens in the Meibomian gland and conjunctival sac: microbiome of normal subjects and patients with Meibomian gland dysfunction. *Infect Drug Resist* 2018; 11:1729–40. doi: 10.2147/IDR.S162135.
34. Kim SJ, Toma HS. Ophthalmic antibiotics and antimicrobial resistance a randomized, controlled study of patients undergoing intravitreal injections. *Ophthalmology* 2011; 118(7):1358–63. doi: 10.1016/j.ophtha.2010.12.014.
35. Kinoshita S, Ueta M. Innate immunity of the ocular surface. *Jpn J Ophthalmol* 2010; 54(3):194–8. doi: 10.1007/s10384-010-0804-2.
36. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chemical immunology and allergy* 2007; 92:36–49. doi: 10.1159/000099252.
37. Koch R. Die Ätiologie der Tuberkulose. Berlin: Robert Koch-Institut; 2010.
38. Kugadas A, Wright Q, Geddes-McAlister J, Gadjeva M. Role of Microbiota in Strengthening Ocular Mucosal Barrier Function Through Secretory IgA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58(11):4593–600. doi: 10.1167/iovs.17-22119.
39. Lang GK, Hrsg. *Augenheilkunde: 5 Hornhaut (Kornea)*. 6., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019.

40. Larkin DF, Leeming JP. Quantitative alterations of the commensal eye bacteria in contact lens wear. *Eye (Lond)* 1991; 5 (Pt 1):70–4. doi: 10.1038/eye.1991.14.
41. McDermott AM. Antimicrobial compounds in tears. *Exp Eye Res* 2013; 117:53–61. doi: 10.1016/j.exer.2013.07.014.
42. Milder E, Vander J, Shah C, Garg S. Changes in antibiotic resistance patterns of conjunctival flora due to repeated use of topical antibiotics after intravitreal injection. *Ophthalmology* 2012; 119(7):1420–4. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.01.016.
43. Mshangila B, Paddy M, Kajumbula H, Ateenyi-Agaba C, Kahwa B, Seni J. External ocular surface bacterial isolates and their antimicrobial susceptibility patterns among pre-operative cataract patients at Mulago National Hospital in Kampala, Uganda. *BMC Ophthalmol* 2013; 13:71. doi: 10.1186/1471-2415-13-71.
44. Münch R. Robert Koch. *Microbes and Infection* 2003; 5(1):69–74. doi: 10.1016/S1286-4579(02)00053-9.
45. Nahar N, Anwar S, Miah MRA. Conjunctival bacterial flora in diabetic patients. *Ibrahim Med. Coll. J.* 2014; 7(1):5–8. doi: 10.3329/imcj.v7i1.17698.
46. Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P. *Mikrobiologische Diagnostik: 8.3 MALDI-TOF-MS-basierte Verfahren zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen. 2., vollständig überarbeitete Auflage.* Stuttgart, New York: Thieme; 2009. (Thieme eRef).
47. Nichols BA. *Conjunctiva. Microsc. Res. Tech.* 1996; 33(4):296–319. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19960301)33:4<296::AID-JEMT2>3.0.CO;2-O.
48. Olson R, Donnenfeld E, Bucci FA, Price FW, Raizman M, Solomon K et al. Methicillin resistance of *Staphylococcus* species among health care and nonhealth care workers undergoing cataract surgery. *Clin Ophthalmol* 2010; 4:1505–14. doi: 10.2147/OPTH.S14333.
49. Orlans HO, Hornby SJ, Bowler ICJW. In vitro antibiotic susceptibility patterns of bacterial keratitis isolates in Oxford, UK: a 10-year review. *Eye (Lond)* 2011; 25(4):489–93. doi: 10.1038/eye.2010.231.
50. Ozkan J, Nielsen S, Diez-Vives C, Coroneo M, Thomas T, Willcox M. Temporal Stability and Composition of the Ocular Surface Microbiome. *Sci Rep* 2017; 7(1):9880. doi: 10.1038/s41598-017-10494-9.
51. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(5):614–8. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300539.
52. Perkins RE, Kundsinn RB, Pratt MV, Abrahamsen I, Leibowitz HM. Bacteriology of normal and infected conjunctiva. *J Clin Microbiol* 1975; 1(2):147–9. doi: 10.1128/jcm.1.2.147-149.1975.

53. Petrillo F, Pignataro D, Lavano MA, Santella B, Folliero V, Zannella C et al. Current Evidence on the Ocular Surface Microbiota and Related Diseases. *Microorganisms* 2020; 8(7). doi: 10.3390/microorganisms8071033.
54. Pippin MM, Le JK. *Bacterial Conjunctivitis*: StatPearls Publishing; 2021 [Stand: 11.09.2021]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk546683/>.
55. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Verfügbar unter: <https://www.R-project.org/>.
56. Ragland SA, Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog* 2017; 13(9):e1006512. doi: 10.1371/journal.ppat.1006512.
57. Rubio EF. Climatic influence on conjunctival bacteria of patients undergoing cataract surgery. *Eye (Lond)* 2004; 18(8):778–84. doi: 10.1038/sj.eye.6701352.
58. Singh P, Gupta A, Tripathy K. *Keratitis*: StatPearls Publishing; 2021 [Stand: 10.10.2021]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559014/>.
59. Smith CH. Bacteriology of the healthy conjunctiva. *Br J Ophthalmol* 1954; 38(12):719–26. doi: 10.1136/bjo.38.12.719.
60. St Leger AJ, Desai JV, Drummond RA, Kugadas A, Almaghrabi F, Silver P et al. An Ocular Commensal Protects against Corneal Infection by Driving an Interleukin-17 Response from Mucosal $\gamma\delta$ T Cells. *Immunity* 2017; 47(1):148-158.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.014.
61. Stapleton F, Willcox MD, Sansey N, Holden BA. Ocular microbiota and polymorphonuclear leucocyte recruitment during overnight contact lens wear. *Aust N Z J Ophthalmol* 1997; 25 Suppl 1:S33-5. doi: 10.1111/j.1442-9071.1997.tb01751.x.
62. Suto C, Morinaga M, Yagi T, Tsuji C, Toshida H. Conjunctival sac bacterial flora isolated prior to cataract surgery. *Infect Drug Resist* 2012; 5:37–41. doi: 10.2147/IDR.S27937.
63. Tabbara KF, Chacra CTB. Infectious Keratitis. In: Tabbara KF, El-Asrar AMA, Khairallah M, Hrsg. *Ocular Infections*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 73–93 (Essentials in Ophthalmology).
64. Wellinghausen N, Bialasiewicz AA, Mino de Kaspar H, Korn K, Schaller U, Zimmermann S. Mikrobiologische Diagnostik bei Infektionen des Auges: Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; deutschsprachige Gesellschaft für Virologie; Deutsche Gesellschaft zur Verhütung von Viruserkrankungen; Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft; 2011 [Stand: 26.10.2020]. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/067-008l_S2k_Mikrobiologische_Diagnostik_bei_Infektionen_des_Auges_2011-07.pdf.

65. Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res* 2013; 117:99–105. doi: 10.1016/j.exer.2013.06.003.
66. Yang AY, Chow J, Liu J. Corneal Innervation and Sensation: The Eye and Beyond. *Yale J Biol Med* 2018; 91(1):13–21.
67. Zhou Y, Holland MJ, Makalo P, Joof H, Roberts CH, Mabey DC et al. The conjunctival microbiome in health and trachomatous disease: a case control study. *Genome Med* 2014; 6(11):99. doi: 10.1186/s13073-014-0099-x.

11 Anhang

11.1 Verzeichnis der akademischen Lehrenden

Prof. Dr. Detlef Bartsch

Prof. Dr. Stefan Bauer

Prof. Dr. Annette Becker

Prof. Dr. Katja Becker

Prof. Dr. Siegfried Bien

Prof. Dr. Sven Bogdan

Prof. Dr. Frank Czubayko

Dr. Barbara Fritz

Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann

Prof. Dr. Max Geraedts

Prof. Dr. Thomas Gress

Prof. Dr. Dr. Christiane Hey

Prof. Dr. Rainer Hofmann

Prof. Dr. Joachim Hoyer

Prof. Dr. Walter Werner Hundt

Dr. Andreas Jerrentrup

Prof. Dr. Doktor Peter Herbert Kann

Prof. Dr. Ralf Kinscherf

Prof. Dr. Tilo Kircher

Prof. Dr. Roland Lill

Prof. Dr. Michael Lohoff

Prof. Dr. Andreas Mahnken

Prof. Dr. Rolf Felix Maier

Prof. Dr. Andreas Neubauer

Prof. Dr. Bernhard Neumüller

Prof. Dr. Christopher Nimsky
Prof. Dr. Dominik Oliver
Dr. Egbert Opitz
Prof. Dr. Axel Frieder Pagenstecher
Dr. Christian-Dominik Peterlein
Prof. Dr. Ardawan Julian Rastan
Prof. Dr. Harald Renz
Prof. Dr. Reinald Repp
Prof. Dr. Manfred Riße
Prof. Dr. Volker Roelcke
Prof. Dr. Steffen Ruchholtz
Prof. Dr. Marco Bernhard Rust
Prof. Dr. Irmtraut Sahmland
Prof. Dr. Bernhard Schieffer
Prof. Dr. Joachim Schneider
Dr. Carmen Schwee
Dr. Carola Seifert
Prof. Dr. Walter Sekundo
Dr. Bernd Stahl
Prof. Dr. Boris Stuck
Prof. Dr. Kati Thieme
Prof. Dr. Lars Timmermann
Prof. Dr. Claus Vogelmeier
Prof. Dr. Uwe Armin Georg Wagner
Dr. Reiner Westermann
Dr. Christian Wrocklage
Prof. Dr. Hinnerk Friedrich Wilhelm Wulf

11.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen mich bei den Personen zu bedanken, die maßgeblich zum Gelingen des Projektes beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Walter Sekundo bedanken, der der Ausarbeitung dieses Projektes den Weg bereitete. Stellvertretend für das Team der Klinik für Augenheilkunde des UKGM am Standort Marburg, das mir klinisch und organisatorisch stets unterstützend zur Seite stand, gilt mein Dank insbesondere Dr. Christoph Paul, der als Studienleiter an der Arbeit beteiligt war und durch seine Ideen und konstruktiven Diskussionen diese Arbeit vorantrieb und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Weiterhin bedanke ich mich bei PD Dr. Frank Sommer stellvertretend für das Team des Instituts für Mikrobiologie des UKGM, mit dessen Unterstützung die mikrobiologischen Analysen ermöglicht wurden.

Ein großer Dank gilt allen Proband:innen, die sich uneigennützig bereit erklärten, an dem Projekt mitzuwirken. Insbesondere möchte ich mich auch bei Elyas Drarbeit bedanken, der sich für den Methodikteil als Fotomodell zur Verfügung stellte.

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen Anfang 2020 und Anfang 2022. In dieser Zeit absolvierte ich zwei Staatsexamen und startete meinen beruflichen Weg als Arzt. Unterdessen musste ich auch gesundheitliche Rückschläge hinnehmen und bin daher umso dankbarer für die Unterstützung aus meinem privaten Umfeld von Freunden und Familie. Allen voran gilt mein Dank meiner Maraike, die mir den Rücken stets freihielt und auch in widrigen Zeiten an meiner Seite stand.