

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. (Lon.) Chr.-P. Lohmann)

# **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

Sophie Köhle

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. (Lon.) Chr.-P. Lohmann)

**Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

Sophie Köhlein

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. (Lon.) Chr.-P. Lohmann
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 30.01.2008 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.06.2008 angenommen.

Gewidmet meinen Eltern, die immer für mich da waren

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	DIE VORDEREN AUGENABSCHNITTE UND IHRE ENTZÜNDUNGEN .....	1
1.2	EPIDEMIOLOGIE UND INZIDENZ .....	2
1.2.1	<i>Epidemiologie und Inzidenz von Keratitiden.....</i>	2
1.2.2	<i>Epidemiologie und Inzidenz von Uveitiden .....</i>	2
1.3	KERATITIS UND UVEITIS ANTERIOR-DERZEITIGE DIAGNOSTISCHE MÖGLICHKEITEN .....	5
1.4	KERATITIDEN UND UVEITIDEN UND IHRE URSACHEN .....	6
1.5	VORLIEGENDE ARBEIT - IHRE ZIELE .....	9
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>10</b>
2.1	DATENGEWINNUNG AUS DEM PATIENTENGUT.....	10
2.2	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	12
2.2.1	<i>Kultur .....</i>	12
2.2.2	<i>Serologie.....</i>	13
2.3	PCR .....	15
2.3.1	<i>Durchführung der PCR (= Polymerase Chain Reaction) .....</i>	15
2.3.2	<i>Die PCR - ihre Vorteile.....</i>	16
2.3.3	<i>Die PCR - ihre Nachteile und Fehlermöglichkeiten.....</i>	17
2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	19
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>20</b>
3.1	ALTERSVERTEILUNG .....	20
3.2	UNTERSUCHUNGSMATERIALIEN.....	22
3.2.1	<i>Keratitis .....</i>	22
3.2.2	<i>Uveitis anterior .....</i>	22
3.3	ERFOLGE DER MIKROBIOLOGISCHEN DIAGNOSTIK .....	24
3.3.1	<i>Erfolge der mikrobiologischen Diagnostik bei Keratitis .....</i>	24
3.3.2	<i>Erfolge der mikrobiologischen Diagnostik bei Uveitis anterior.....</i>	26
3.4	NACHGEWIESENE ERREGER .....	29
3.4.1	<i>Keratitis .....</i>	29
3.4.1.1	<i>Kultureller Nachweis der Erreger .....</i>	29
3.4.1.2	<i>Serologischer Nachweis der Erreger.....</i>	29
3.4.1.3	<i>Nachweis der Erreger mit PCR.....</i>	30
3.4.1.4	<i>Erregerspektrum bei Keratitis .....</i>	31
3.4.2	<i>Uveitis anterior .....</i>	31
3.4.2.1	<i>Kultureller Nachweis der Erreger .....</i>	31

3.4.2.2 Serologischer Nachweis der Erreger.....	32
3.4.2.3 Nachweis der Erreger mit PCR.....	32
3.4.2.4 Erregerspektrum bei Uveitis anterior.....	33
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>34</b>
4.1 KERATITIS .....	34
4.2 UVEITIS ANTERIOR .....	40
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>44</b>
<b>6. SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>45</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>47</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>52</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>55</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>56</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die vorderen Augenabschnitte und ihre Entzündungen

Keratitis und Uveitis anterior zählen unter anderem zu den Entzündungen des vorderen Augenabschnittes.

Unter einer Keratitis versteht man eine entzündliche Erkrankung der Hornhaut.

Die Uveitis anterior stellt laut internationaler Uveitis-Studiengruppe einen zusammenfassenden Begriff für Iritis und Iridozyklitis dar (Bloch-Michel, Nussenblatt, 1987).

Entzündungen des Auges können akut, subakut oder chronisch auftreten. Zu den Kardinalsymptomen einer akuten Entzündung zählen Schmerzen, Rötung, Schwellung und Beeinträchtigung der Funktion. In Folge der Vasodilatation und der Verlangsamung des Blutflusses kommt es zum Austritt von Plasmaproteinen und Leukozyten sowie zur Emigration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in den Extravasalraum.

Eine chronische Entzündung kann Monate bis Jahre andauern. Dabei infiltrieren mononukleäre Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen in das Gewebe, welches dadurch zerstört wird. Derart chronische Entzündungen können entweder Folge einer akuten Reaktion sein oder können von selbst mit asymptomatischem Verlauf in Erscheinung treten.

## 1.2 Epidemiologie und Inzidenz

### 1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz von Keratitiden

Eine Infektion der Cornea gilt als einer der Hauptgründe für einen Sehverlust, und es wird vermutet, dass es derzeit weltweit 100.000 Keratitiden pro Jahr gibt, 30.000 Fälle davon in den USA (Knox et al, 1998).

### 1.2.2 Epidemiologie und Inzidenz von Uveitiden

Eine Uveitis kommt in jedem Alter überall auf der Welt vor. Eine gravierende Komplikation stellt die Erblindung dar. Dabei wird oftmals übersehen, dass die Uveitis selbst für die Erblindungen verantwortlich ist und nicht die mit ihr häufig auftretenden Komplikationen wie Glaukom und Katarakt.

In den USA, in Frankreich und Dänemark ist die Prävalenz von Uveitiden sehr ähnlich. Sie beträgt in den USA 38 pro 100.000 Einwohner, in Frankreich 17 Fälle pro 100.000 Einwohner und in Dänemark 14 Fälle pro 100.000 Einwohner.

Die Inzidenz beträgt in den USA 38.000 Fälle pro Jahr (Foster, Vitale, 2002).

In Entwicklungsländern sind keine Daten zu Prävalenz und Inzidenz von Uveitiden vorhanden.

Die akuten Uveitis lässt sich in die Uveitis anterior und die Uveitis posterior unterteilen, wobei erstere deutlich häufiger auftritt. Eine seltene Form stellt die Uveitis intermedia dar.

Weiter verbreitet als die akuten Formen sind chronische Uveitiden und treten häufig gleichzeitig mit einer Uveitis intermedia auf. Nicht-infektiöse Uveitiden treten weitaus häufiger auf als infektiöse Uveitiden. Diese erregerbedingten Uveitiden sind oft bei Patienten anzutreffen, die gleichzeitig unter einer Panuveitis oder Uveitis anterior leiden (Foster, Vitale, 2002).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

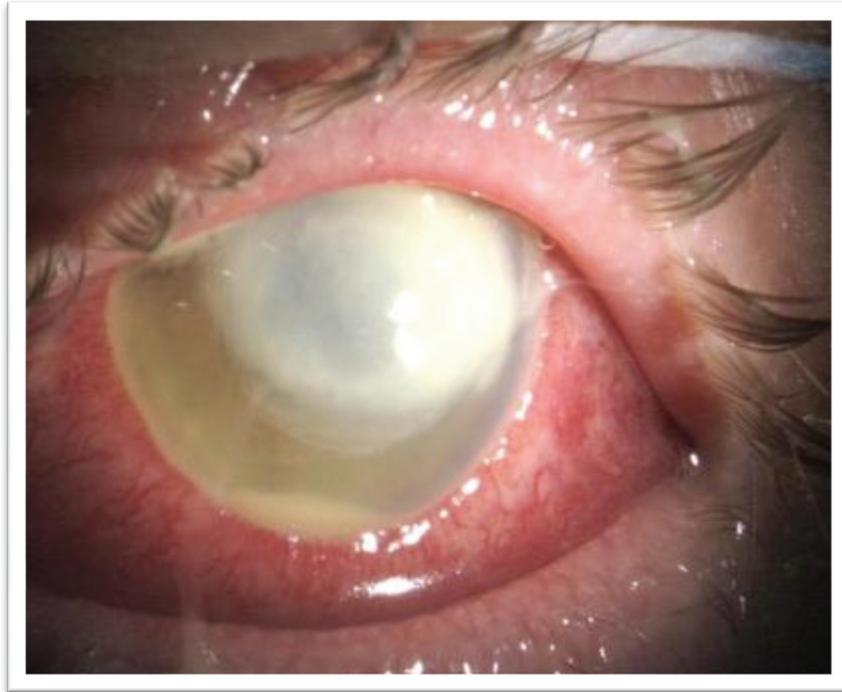


Abb. 1.1: Hornhautulcus mit Hypopyon nach Keratitis<sup>1</sup>

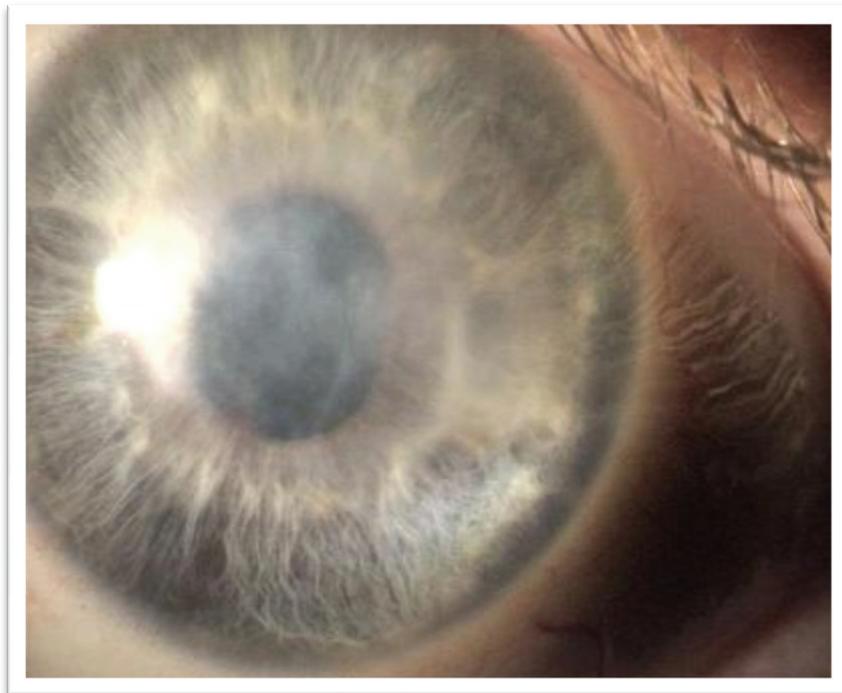


Abb. 1.2: Diffuse Narbenbildung nach Keratitis<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Gabel, Universitätsaugenklinik Regensburg  
<sup>2</sup> Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Gabel, Universitätsaugenklinik Regensburg

Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

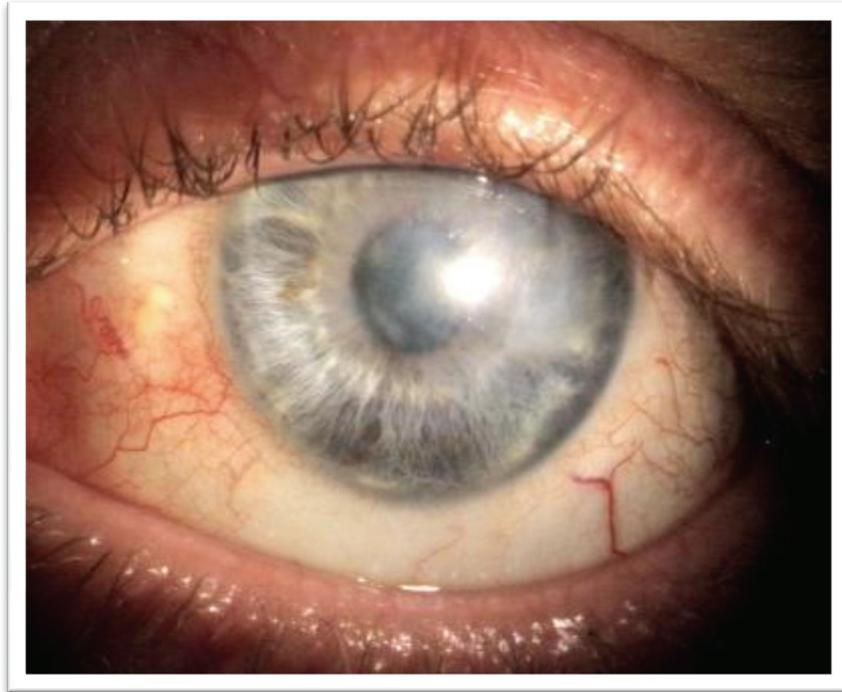


Abb. 1.3: Diffuse Narbenbildung nach Keratitis<sup>3</sup>

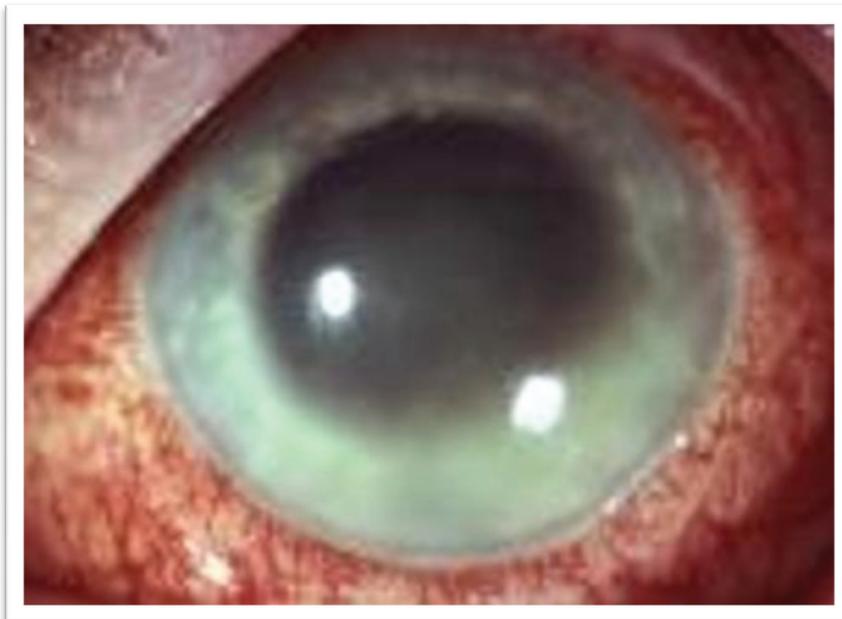


Abb. 1.4: Uveitis anterior<sup>4</sup>

---

<sup>3</sup> Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Gabel, Universitätsaugenklinik Regensburg  
<sup>4</sup> Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. H. Busse

### **1.3 Keratitis und Uveitis anterior-derzeitige diagnostische Möglichkeiten**

Zu Beginn spielen wie bei allen Erkrankungen die sorgfältige Anamnese und die Untersuchung des Auges durch den klinisch tätigen Arzt eine herausragende Rolle. Entsprechend der Verdachtsdiagnose wird dann Patientenmaterial für die mikrobiologische Untersuchung entnommen. Schnellstmöglich werden die Proben in speziellen Medien, um eine Vermehrung der irrelevanten Keime zu verhindern, ins Labor transportiert. Die Labordiagnostik bietet nun verschiedene Möglichkeiten des Erregernachweises. Dieser beginnt bei Erkrankungen durch Bakterien, Pilze und Protozoen in der Regel mit der direkten mikroskopischen Untersuchung des Patientenmaterials.

Das Anzüchten der Erreger in Reinkultur hat große Bedeutung, zum einen, um durch Betrachten der Koloniemerkmale die Bakterienart zu identifizieren, zum anderen um Antibiotikaresistenzen zu bestimmen.

Serologisch lassen sich sowohl Antigene als auch Antikörper nachweisen. Dies ist vor allem bei viralen und parasitären Infektionen bedeutungsvoll. Die Erkennung der induzierten Immunkomplexe erfolgt zum Beispiel mittels Enzymen. Dafür stehen der ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent-Assay), der IFT (Immunfluoreszenztest) oder der RIA (Radio-Immuno-Assay) zur Verfügung.

Ein Fortschritt in der Erregerdiagnostik ist in der Entwicklung von molekularbiologischen Verfahren zu sehen. Man unterscheidet hierbei die Methode der Hybridisierung (spezifische Bindung von Erreger-Nukleinsäuresequenzen an gentechnologisch hergestellte, markierte, komplementäre DNA-Sonden) von Chain Reaction).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

der Amplifizierung erregerspezifischer Gensequenzen (PCR = Polymerase Keratitiden und Uveitiden und ihre Ursachen

Keratopathien, das Tragen von Kontaktlinsen und Traumen stellen die Risikofaktoren für die Entwicklung einer Keratitis dar. Virale Keratitiden sind oftmals durch Adenoviren verursacht. Koagulasenegative Staphylokokken lassen sich häufig bei bakteriell bedingten Entzündungen isolieren. Mykobakterien, Parasiten und Pilze stellen recht seltene Auslöser einer Keratitis dar (Bialasiewicz, 1996).

Traumen, immunologische Mechanismen und Infektionen können im Allgemeinen eine Uveitis verursachen. Sehr häufig kommt es auch unter immunsuppressiven Zuständen zu entzündlichen Reaktionen im Auge, denn der Organismus ist dann anfälliger für Infektionen mit Pathogenen. Uveitis anterior, Uveitis intermedia und Panuveitis sind meist idiopathischer Herkunft. Die Uveitis posterior wird oftmals durch Toxoplasmen verursacht (Foster, Vitale, 2002). In folgenden Abbildungen sind die häufigsten Ursachen von Uveitiden dargestellt (Abbildungen 1.5.-1.8.).

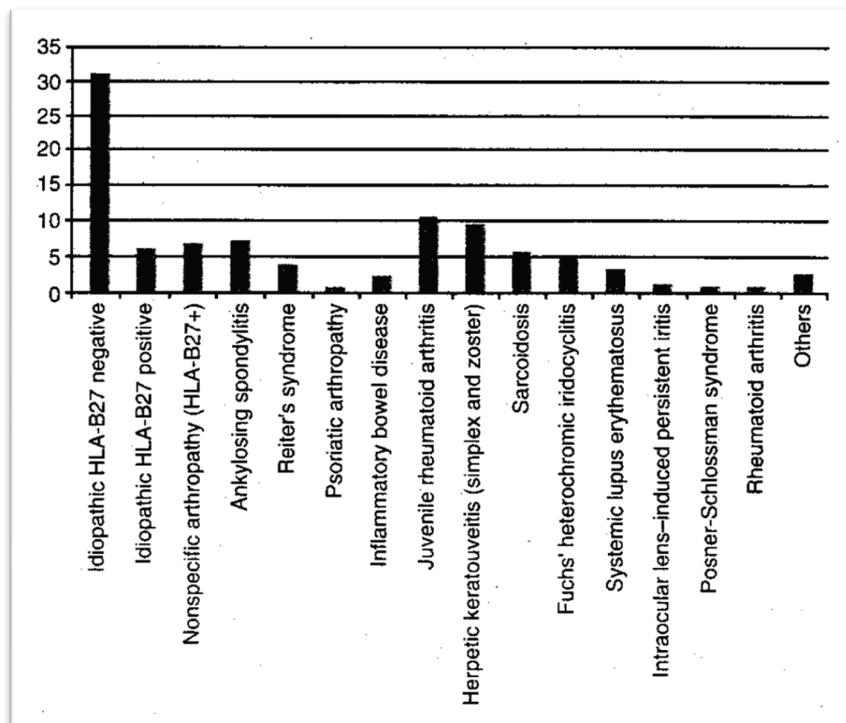


Abb. 1.5: Die häufigsten Ursachen einer Uveitis anterior\*

Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

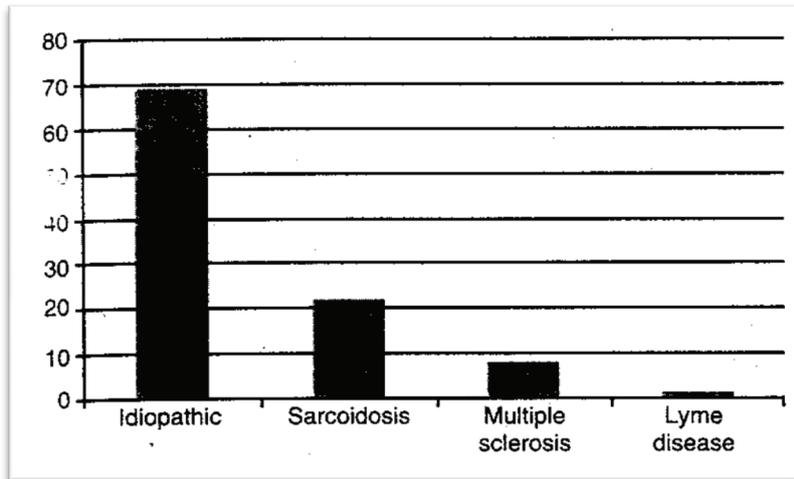


Abb. 1.6: Die häufigsten Ursachen einer Uveitis intermedia\*

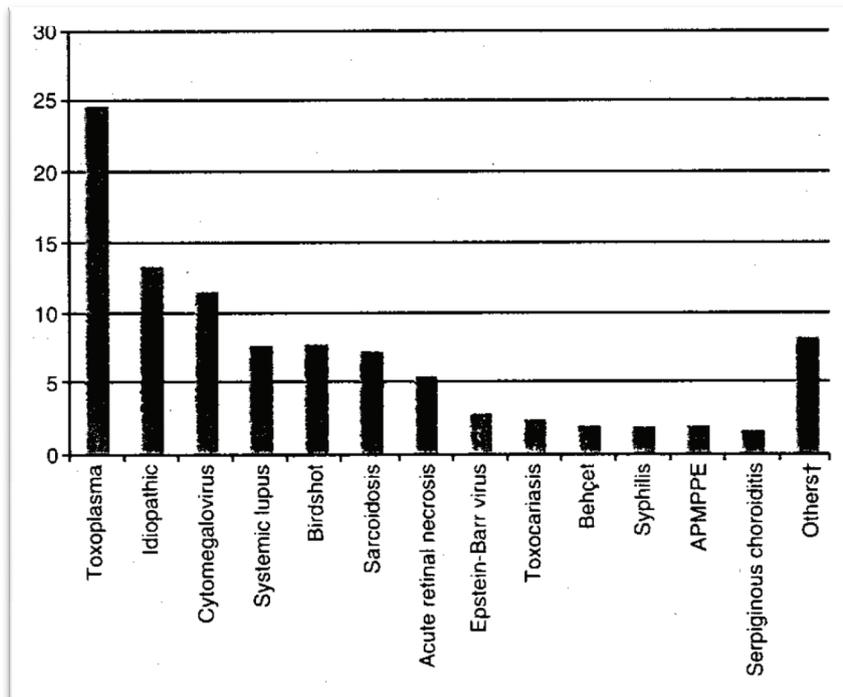


Abb. 1.7: Die häufigsten Ursachen einer Uveitis posterior\*

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

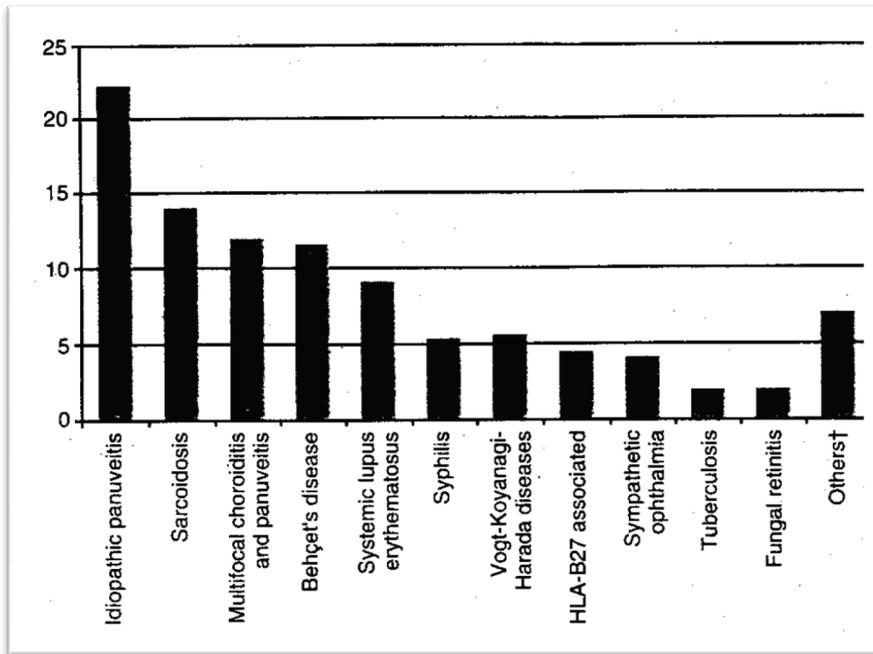


Abb. 1.8: Die häufigsten Ursachen einer Panuveitis\*

\* aus Foster, Vitale, 2002

## 1.4 Vorliegende Arbeit - ihre Ziele

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Studie über 84 Patienten mit Uveitis anterior und 87 Patienten mit Keratitis, behandelt an der Universitäts-Augenklinik Regensburg im Zeitraum von 1996-2003.

Es wurde versucht die diese Entzündungen verursachenden Erreger mittels PCR, einer molekularbiologischen Methode, zu identifizieren. Diese Studie soll den Stellenwert der PCR in der mikrobiologischen Diagnostik von Uveitis anterior und Keratitis untersuchen und verdeutlichen. Dafür werden die Erfolgsraten herkömmlicher Untersuchungsmethoden (Kultur und Serologie) berechnet und im Vergleich zur PCR dargestellt. Schließlich sind auch die bei positiven mikrobiologischen Ergebnissen nachgewiesenen Erreger von Interesse.

Insgesamt gilt es herauszufinden, ob es sinnvoll ist, die PCR trotz höherer Kosten zusätzlich zur Kultur, Serologie und Mikroskopie einzusetzen. Es sollen die Schwachstellen der einzelnen diagnostischen Verfahren aufgedeckt und Verbesserungsvorschläge gegeben werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Datengewinnung aus dem Patientengut

Für diese retrospektive Studie wurden den Krankenakten von Patienten, die im Zeitraum von 1996-2003 in der Augenklinik der Universität Regensburg wegen Entzündungen der vorderen Augenabschnitte (Uveitis anterior und Keratitis) behandelt wurden, Daten entnommen.

Die Studie wurde an insgesamt 171 Patienten aller Altersgruppen durchgeführt. Davon entfielen 84 Akten an Patienten mit Uveitis anterior und 87 Akten an Patienten mit Keratitiden (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1

	Weibliche Patienten	Männliche Patienten
Uveitis anterior	45	39
Keratitis	43	44
<b>Summe</b>	<b>88</b>	<b>83</b>

Das Hauptaugenmerk bei der Analyse der Daten fiel auf die mikrobiologische Diagnostik.

Aus der Durchsicht der Akten wurden die einzelnen Diagnosen, die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen, sowie bei deren positiven Ausgang die Erreger erfasst.

Um die positiven bzw. negativen PCR-Ergebnisse, aber auch die Über- bzw. Unterlegenheit dieser neuen Methode zu demonstrieren, wurden bei der Auswertung verschiedene Gruppen gebildet (Tabelle 2-2).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

**Tabelle 2-2**

	PCR+	PCR+	PCR-	PCR-	PCR+	PCR+	PCR-	PCR-
	Kultur+	Kultur-	Kultur+	Kultur-	Serologie+	Serologie-	Serologie+	Serologie-
Uveitisanterior								
Keratitis								

Durch diese Unterscheidung war es möglich, diejenigen Fälle zu ermitteln, bei denen PCR und herkömmliche mikrobiologische Untersuchungsmethoden eine Bestimmung des Erregers ermöglichten. Es konnten aber auch die Schwachstellen in den jeweiligen diagnostischen Verfahren aufgedeckt werden.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

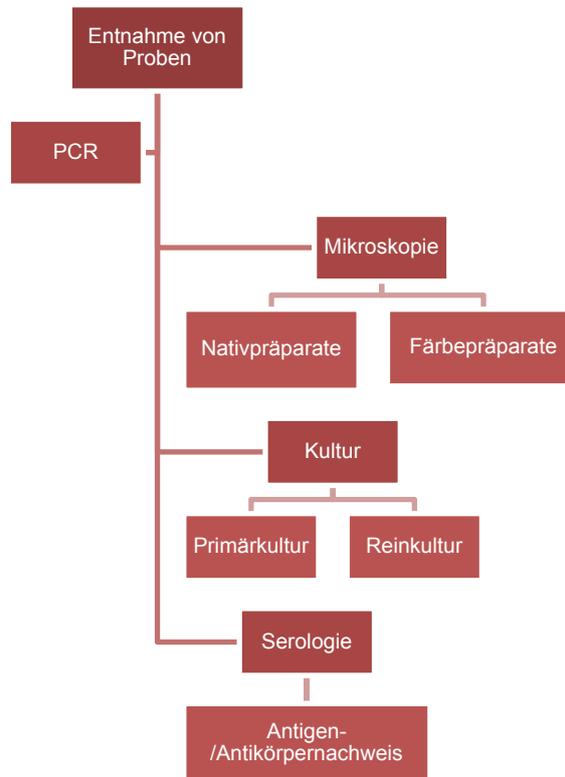


Abb. 2.1: Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Kultur

Damit eine Speziesdiagnose von Bakterien und Pilzen gemacht werden kann, werden die Erreger zunächst vermehrt. Es entsteht die Primärkultur, die erste Kultur aus dem Untersuchungsmaterial. Prinzipiell werden die Pathogene, die im Untersuchungsmaterial enthalten sind, auf festen und auf flüssigen Nährböden zur Vermehrung gebracht. Bei Betrachtungen der Kultur auf festen Medien unterscheidet man Hämolyseart (vollständig, unvollständig, fehlend), Form, Erhebung und Randzustand der Kolonien. Bei flüssigem Untersuchungsmaterial ist es wichtig darauf zu achten, unter welcher Sauerstoffzufuhr die Erreger wachsen, ob sie eine Kahmhaut bilden oder ob die Lösung getrübt ist.

Um dann aus der Primärkultur eine Reinkultur herzustellen, ist es von Bedeutung, dass die klinischen Symptome in eine bestimmte Verdachtsrichtung weisen. Nur so ist es möglich, die Nährstoffbedingungen des mutmaßlichen Erregers zu schaffen (Hahn et al, 1994).

### 2.2.2 Serologie

Falls der direkte Nachweis der Erreger nicht möglich ist (z.B. das infizierte Gebiet ist für eine Probenentnahme nicht geeignet oder der Keim ist schon verschwunden) gibt es die Möglichkeit, spezifische Antikörper im Serum nachzuweisen. Falls der Organismus Kontakt mit dem Erreger hat, bilden sich in den meisten Fällen zuerst IgM-Antikörper, die nur eine kurze Verweildauer haben. Nach einer gewissen Zeit werden IgG-Antikörper produziert. Nun kann anhand der Antikörperklasse entschieden werden, ob eine akute Infektion (IgM-Antikörper) vorliegt, ob die Infektion eine gewisse Zeit zurückliegt oder ob es sich um einen Durchseuchungstiter handelt (IgG-Antikörper).

Um spezifische Antikörper nachzuweisen gibt es Verfahren wie beispielsweise Neutralisationstests, Präzipitationsreaktionen, Agglutinationsreaktionen, Komplementbindungsreaktionen, Enzymimmunoassays (ELISA), indirekte Immunfluoreszenztests (IFT) und Immunoblots.

Zu beachten ist aber, dass der besondere Immunstatus des Auges die serologische Diagnostik bei z.B. viralen Infektionen begrenzt. Es existiert eine Blut-Retina- und Blut-Kammerwasser-Schranke, die im gesunden Auge den Blutkreislauf von den Flüssigkeiten im Auge trennt. In Folge einer intraokulären Entzündung können diese Schranken durchlässig werden und Antikörper können passiv aus dem Blut in das Auge diffundieren. Antikörper können aber auch direkt im Auge von B-Zellen produziert werden.

Aufgrund dieser beiden möglichen Produktionsorte ist für eine aussagekräftige Bestimmung des Antikörpertiters sowohl eine Untersuchung des peripheren Blutes als auch des Kammerwassers notwendig. Mit Hilfe der Ergebnisse lässt sich der Goldmann-Witmer-Koeffizient (K) berechnen:

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

### Formel:

$$K = \frac{\text{Antikörpertiter im Kammerwasser} \times \text{Immunglobulinkonzentration im Serum}}{\text{Antikörpertiter im Serum} \times \text{Immunglobulinkonzentration im Kammerwasser}}$$

Dieser Koeffizient lässt eine Interpretation der gefundenen Antikörpertiter zu.

Bei  $K = 0.5-2$  werden keine Immunglobuline im Auge gebildet. Bei einem Wert größer 4 kann man sicher von einer intraokulären Antikörperproduktion ausgehen. Folglich ist der alleinige Nachweis von Antikörpern im Serum nicht beweisend für eine Infektion im Auge (Thurau, 2003).

## 2.3 PCR

### 2.3.1 Durchführung der PCR (= Polymerase Chain Reaction)

Jeder Organismus (Bakterien, Viren, Pilze) enthält in seinem Inneren die Erbinformation in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA). Diese besteht aus derart charakteristischen Frequenzbereichen, dass es möglich ist, alle bekannten Organismen zu typisieren.

Die PCR, erstmals beschrieben durch Saiki et al (Saiki et al, 1985), entwickelte sich in den letzten Jahren zu einer sehr sensitiven Methode, um DNA oder RNA in klinischen Untersuchungsmaterialien (Blut, Liquor, Zellmaterial) nachzuweisen. Sie imitiert in groben Zügen den Prozess, der bei der DNA-Verdopplung während der natürlichen Zellteilung stattfindet.

Bei der Durchführung der PCR wird die DNA zunächst erhitzt und dadurch in zwei Einzelstränge zerlegt. Liegt das Genom in Form von RNA vor, so wird diese durch die Reverse Transkriptase (RT-PCR) in komplementäre DNA umgewandelt.

Nun muss eine speziesspezifische Struktur der Nukleinsäure bekannt sein, um zwei zu ihr komplementäre Primer herzustellen.

Von der thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) werden diese Primer erkannt. Dieses Enzym erstellt durch den Einbau von Desoxynukleotidtriphosphaten zwei zu den ursprünglichen DNA-Strängen komplementäre Nukleinsäuren.

Da diese neu entstandenen DNA-Stränge genau identisch mit den Ursprungssträngen sind, können sie selbst wieder als Ausgangsmaterial für einen weiteren Replikationszyklus fungieren (vgl. Abbildung 2.2.). Theoretisch erreicht man nach 30 Temperaturzyklen einen Amplifikationsfaktor von  $10^9$ . In der Praxis werden jedoch aufgrund des Aktivitätsverlustes der DNA-Polymerase und des Verbrauches von Primermolekülen und Nukleotiden „nur“ Werte um  $10^6$  erzielt (Ehrlich et al, 1991; Reischl, Mayer, 1993).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Durch Hybridisierung mit Gensonden, durch Spaltung mit Restriktionsenzymen oder durch Sequenzierung können die Produkte nach der Amplifikation typisiert werden. Daneben ist auch eine Größenbestimmung durch Gelelektrophorese möglich.

Als Ausgangsmaterialien für die Gewinnung von Nukleinsäuren werden in der Ophthalmologie Flüssigkeiten (Tränenflüssigkeit, Kammerwasser, Glaskörperspirat) oder Gewebeproben (Tränendrüse, Hornhaut, Netzhaut) verwendet.

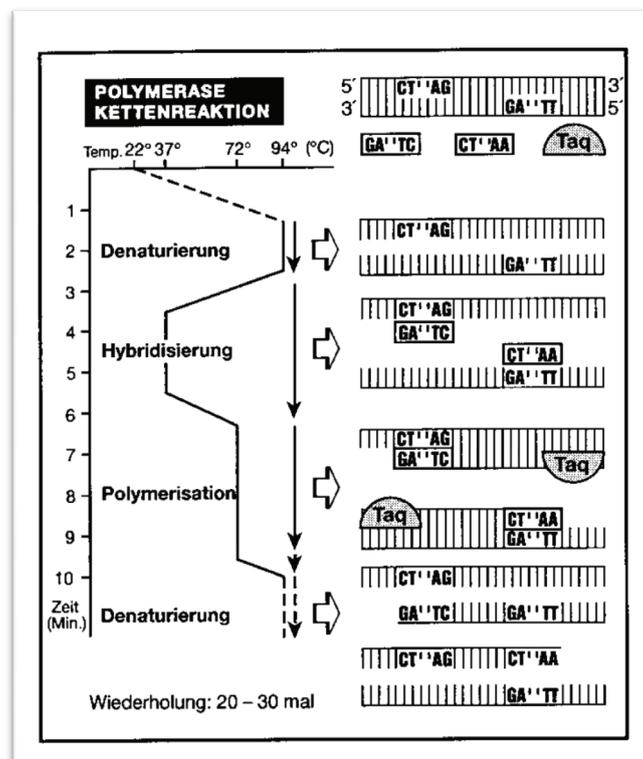


Abb. 2.2: Die PCR aus Hahn et al, 1994

### 2.3.2 Die PCR - ihre Vorteile

Als Ausgangsmaterialien für die Gewinnung von Nukleinsäuren werden in der Ophthalmologie Flüssigkeiten (Tränenflüssigkeit, Kammerwasser, Glaskörperspirat) oder Gewebeproben (Tränendrüse, Hornhaut, Netzhaut) verwendet. Dabei kommt es vor, dass die Menge der extrahierten Erreger nicht ausreicht. Hier stoßen die üblichen Nachweisverfahren an ihre Grenzen. Um jedoch Erreger mit der PCR nachweisen zu können, sind 1µl Glaskörper- oder Vorderkammerflüssigkeit zur Infektionsdiagnostik ausreichend.

### **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

Es müssen nur 10-100 Erreger pro ml Probe vorhanden sein, d.h. die PCR besitzt eine sehr hohe Sensitivität (Becker et al, 2003).

Der Erregernachweis ist zum Beispiel nach Antibiotikagabe oftmals schwierig, da die Anzahl der Pathogene auf ein Minimum reduziert ist. Somit wird ein Nachweis durch kulturelle Anzucht hinfällig, und es ist sinnvoll die PCR einzusetzen.

Ein weiterer großer Vorteil der PCR liegt darin, dass die medikamentöse Therapie früher eingeleitet werden kann, da schon wenige Stunden nach Probenentnahme erste Ergebnisse vorliegen (Reischl, 2003).

Bei viralen Infektionen besteht oft ein Problem darin, dass Antikörper spät gebildet werden und der serologische Nachweis deshalb negativ ist. Um diese diagnostische Lücke zu schließen, wird zusätzlich die PCR verwendet, mit deren Hilfe ein direkter Virusnachweis möglich ist.

Eine große Bedeutung der PCR für die Klinik besteht darin, auch schwer oder nicht anzüchtbare Erreger bestimmen zu können (Chlamydien, Coxiellen, Mykobakterien, Legionellen, Treponemen und Listerien).

Auch der Nachweis ganzer Erregergruppen stellt für die PCR kein Problem dar, was sich im Sinne der Ausschlussdiagnostik als sinnvoll erweist.

#### **2.3.3 Die PCR - ihre Nachteile und Fehlermöglichkeiten**

Da die PCR ein sehr empfindliches Nachweisverfahren ist, können durch Kontaminationen leicht falsch positive Ergebnisse entstehen. Eine strikte räumliche Trennung von Probenaufbereitung, Herstellung des Reaktionsgemisches und der Analyse der Amplifikationsprodukte sind erforderlich, um solche Ergebnisse zu verhindern (Lohmann, Reischl, 1997).

Nicht nur falsche Primer oder DNA-Polymerase Inhibitoren wie z.B. Hämoglobin oder Heparin im Untersuchungsmaterial, sondern auch die falsche Entnahme des Probenmaterials können zu falsch negativen Ergebnissen führen. Trotz

### **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

zahlreicher Techniken zur DNA-Präparation gelingt es nicht immer, diese Inhibitoren zu entfernen. Durch Positiv- und Negativkontrollen versucht man diese Fehler zu vermeiden.

Ein positiver Nachweis durch die PCR stellt sicher, dass die DNA des jeweiligen Erregers vorhanden ist. Daraus ist aber weder ersichtlich, ob der Erreger tot oder lebendig ist, noch kann eine latente Infektion von einer floriden unterschieden werden. Deshalb sollte in jede Diagnose das klinische Bild und die Anamnese mit einbezogen werden.

Genauso wenig wird deutlich, ob Resistenzen vorhanden sind oder nicht.

Mangelnde Standardisierung zwischen den verschiedenen diagnostischen Laboratorien sowie die hohen Kosten eines Nachweises durch die PCR verzögern ihre Durchsetzung im klinischen Alltag (Reischl, 2003).

## 2.4 Statistische Auswertung

Nach dem „exakten Test von McNemar“ wurden Signifikanzen berechnet (Wit-ting, 1985) und es wurde ein Promill als Signifikanzniveau akzeptiert.

Im Anhang befindet sich die ausführliche statistische Auswertung.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Altersverteilung

Bei allen Entzündungen des vorderen Augenabschnittes ist eine Häufung im höheren Lebensalter feststellbar (Abbildungen 3.1 und 3.2).

#### Keratitis

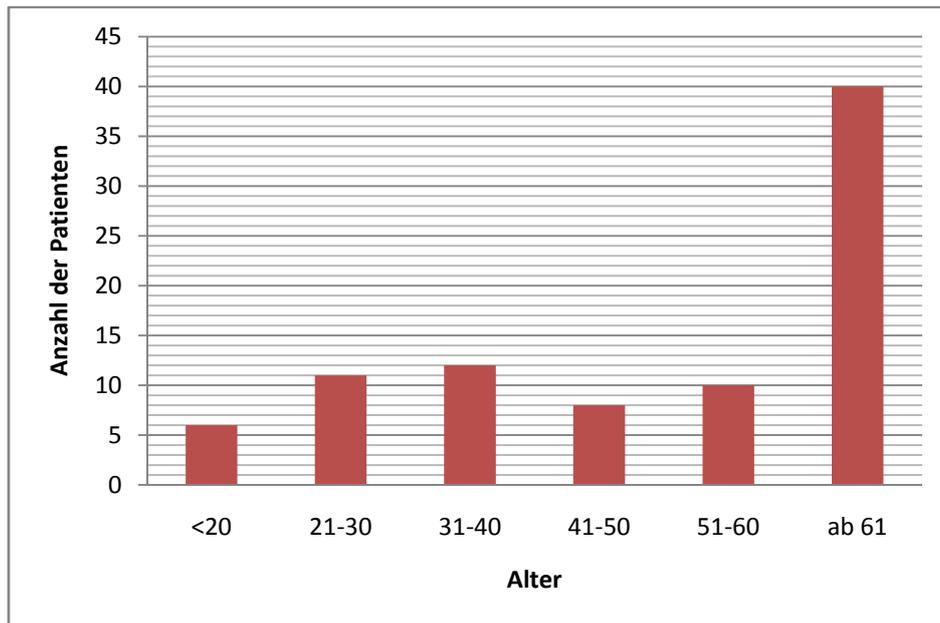


Abb. 3.1

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

### Uveitis anterior

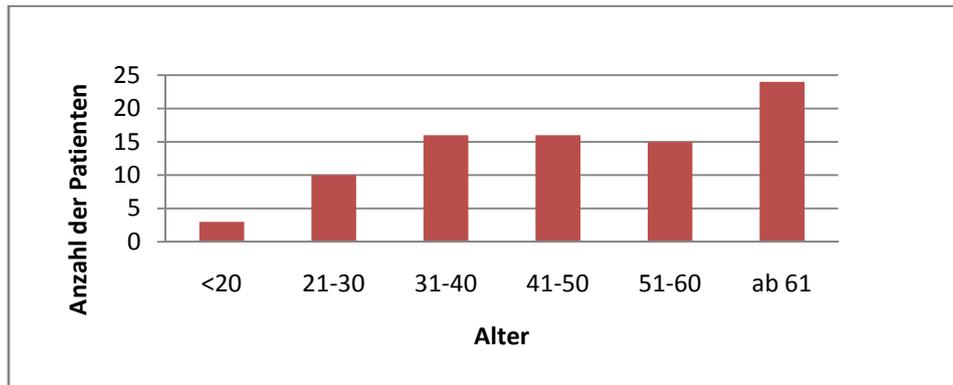


Abb. 3.2

## 3.2 Untersuchungsmaterialien

### 3.2.1 Keratitis

Bei 59 von den 87 Keratitis-Patienten wurde ein Hornhautscraping (Abtragung der Hornhaut) durchgeführt. In diesem Material konnte in 37 Fällen ein Erreger nachgewiesen werden. Bei 28 Patienten wurde Kammerwasser aus der Vorderkammer entnommen, in 11 Fällen konnte darin ein Erreger identifiziert werden (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1

	<b>Hornhautscraping</b>	<b>Vorderkammerpunktion</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Entnahmen</b>	59 67,8%	28 32,2%	<b>87</b> <b>100%</b>
<b>Erregernachweis erfolgreich</b>	37 <b>62,7%</b>	11 <b>39,3%</b>	<b>48</b> <b>55,2%</b>

Diese Untersuchungsmaterialien dienten als Grundlage für die Durchführung von 87 PCR- Reaktionen (100%), 16 serologische Untersuchungen (18,4%) und die Anlage von 71 Kulturen (81,6%).

### 3.2.2 Uveitis anterior

Kammerwasser aus der Vorderkammer wurde bei 70 der 84 Patienten mit Uveitis anterior entnommen. In 23 Fällen konnte ein Erreger nachgewiesen werden. Glaskörpermaterial wurde in 14 Fällen entnommen. Bei 7 Patienten war der Erregernachweis erfolgreich (Tabelle 3-2).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Tabelle 3-2

	<b>Vorderkammerpunktion</b>	<b>Glaskörperaspirat</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Entnahmen</b>	70	14	<b>84</b>
	83,3%	16,7%	<b>100%</b>
<b>Erregernachweis</b>	23	7	<b>30</b>
<b>erfolgreich</b>	<b>32,9%</b>	<b>50%</b>	<b>35,7%</b>

Ausgehend von diesen Untersuchungsmaterialien wurde bei 84 Patienten eine PCR (100%) und bei 25 Patienten (29,8%) eine serologische Untersuchung durchgeführt. In 59 Fällen (70,2%) wurde eine Kultur angelegt.

### 3.3 Erfolge der mikrobiologischen Diagnostik

#### 3.3.1 Erfolge der mikrobiologischen Diagnostik bei Keratitis

Das Material, das von 87 Patienten mit Keratitis untersucht wurde, lieferte in 8 Fällen ein gleichzeitig positives Ergebnis von PCR und Kultur (9%). In 14 Fällen war die PCR der Kultur überlegen (16,1%) und in 10 Fällen (11,5%) unterlegen. Bei 39 Patienten konnte weder mit PCR noch mit Kultur ein Erreger identifiziert werden (44,8%). PCR und Serologie erzielten in 11 Fällen gleichzeitig ein positives Ergebnis (12,6%). Die Serologie war der PCR in einem Fall unterlegen (1%) und in 4 Fällen überlegen (5%) (Tabellen 3-3 und 3-4).

Tabelle 3-3

PCR+ Kultur+	PCR+ Kultur-	PCR- Kultur+	PCR- Kultur-	PCR+ Serologie+	PCR+ Serologie-	PCR- Serologie+	PCR- Serologie-
8	14	10	39	11	1	4	0

Tabelle 3-4

PCR+ Kultur+	PCR+ Kultur-	PCR- Kultur+	PCR- Kultur-	PCR+ Serologie+	PCR+ Serologie-	PCR- Serologie+	PCR- Serologie-
9%	16,1%	11,5%	44,8%	12,6%	1%	5%	0%

Die positiven und negativen PCR-, Kultur- und Serologie-Ergebnisse wurden addiert. Ebenso wurde mit den negativen Ergebnissen verfahren.

Die PCR hatte insgesamt in 38,7% der Fälle Erfolg. Die Kultur war in 20,5% der Fälle positiv, serologisch erzielte man in 17,6% der Fälle ein positives Ergebnis. Mittels PCR konnte in 61,3% der Fälle kein Erreger nachgewiesen werden. Auch die Kultur erreichte bei 60,9% der Untersuchungsmaterialien kein positives Ergebnis. Die Serologie war in 1% der Fälle negativ (Tabelle 3-5).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Tabelle 3-5

PCR+	Kultur+	Serologie+	PCR-	Kultur-	Serologie-
38,7%	20,5%	17,6%	61,3%	60,9%	1%

Positive Ergebnisse von PCR, Kultur und Serologie im Vergleich; bezogen auf 87 Untersuchungsmaterialien von Keratitis-Patienten (Abbildung 3.3)

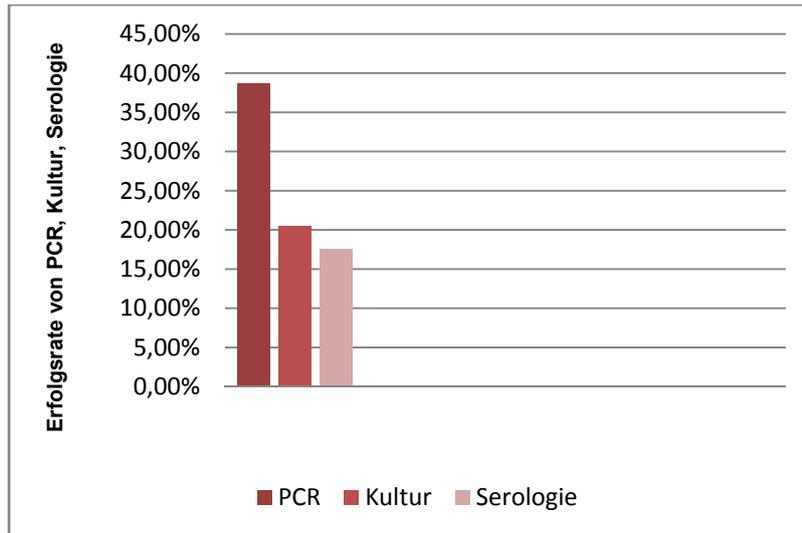


Abb. 3.3

Negative Ergebnisse von PCR, Kultur und Serologie im Vergleich; bezogen auf 87 Untersuchungsmaterialien von Keratitis-Patienten (Abbildung 3.4)

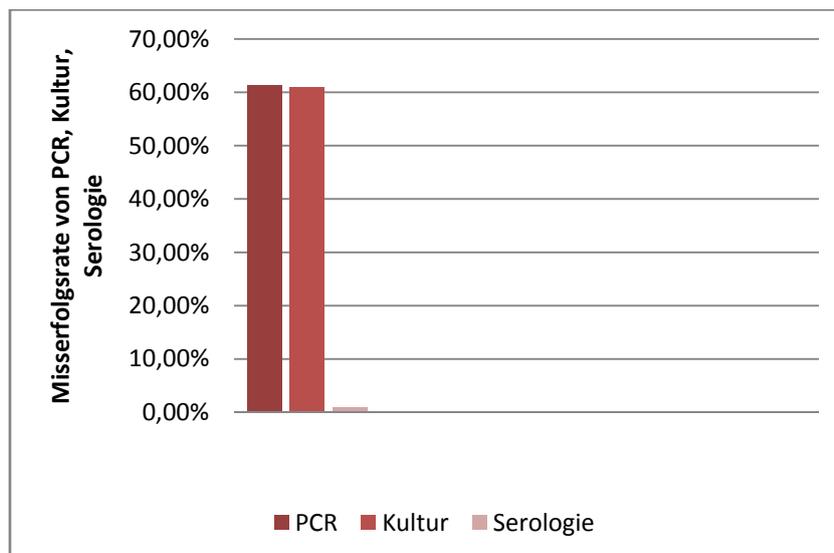


Abb. 3.4

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

### 3.3.2 Erfolge der mikrobiologischen Diagnostik bei Uveitis anterior

Aus dem Material, das von 84 Patienten mit Uveitis anterior untersucht wurde, konnte mit Hilfe der PCR in 6 Fällen ein positives Ergebnis bestimmt werden, bei gleichzeitig negativem Kulturergebnis (7,1%). In einem Fall waren PCR und Kultur einander ebenbürtig (1%). Die PCR war der Kultur bei 4 Patienten unterlegen (4,8%). In 48 Fällen wurde weder mit PCR noch mit Kultur ein Erreger identifiziert (57,1%). PCR und Serologie waren bei 3 Patienten gleichzeitig positiv (3,6%) und bei 6 Patienten gleichzeitig negativ (7,1%). Die Serologie war der PCR in 15 Fällen überlegen (17,9%) und in nur einem Fall unterlegen (1,2%) (Tabellen 3-6 und 3-7).

**Tabelle 3-6**

PCR+	PCR+	PCR-	PCR-	PCR+	PCR+	PCR-	PCR-
Kultur+	Kultur-	Kultur+	Kultur-	Serologie+	Serologie-	Serologie+	Serologie-
1	6	4	48	3	1	15	6

**Tabelle 3-7**

PCR+	PCR+	PCR-	PCR-	PCR+	PCR+	PCR-	PCR-
Kultur+	Kultur-	Kultur+	Kultur-	Serologie+	Serologie-	Serologie+	Serologie-
1%	7,1%	4,8%	57,1%	3,6%	1,2%	17,9%	7,1%

Die positiven PCR-, Kultur- und Serologie-Ergebnisse wurden addiert. Ebenso wurde mit den negativen Ergebnissen verfahren.

Die PCR hatte insgesamt in 13,1% der Fälle Erfolg. Die Kultur war in 6,0% der Fälle positiv, serologisch erzielte man in 21,5% der Fälle ein positives Ergebnis. Die PCR konnte in 86,9% der Fälle kein Pathogen nachweisen. Auch die Kultur erreichte in 64,2% der Untersuchungsmaterialien kein positives Ergebnis. Die Serologie war in 8% der Fälle negativ (Tabelle 3-8).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Tabelle 3-8

PCR+	Kultur+	Serologie+	PCR-	Kultur-	Serologie-
13,1%	6,0%	21,5%	86,9%	64,2%	8%

Positive Ergebnisse von PCR, Kultur und Serologie im Vergleich; bezogen auf 87 Untersuchungsmaterialien von Uveitis anterior-Patienten (Abbildung 3.5)

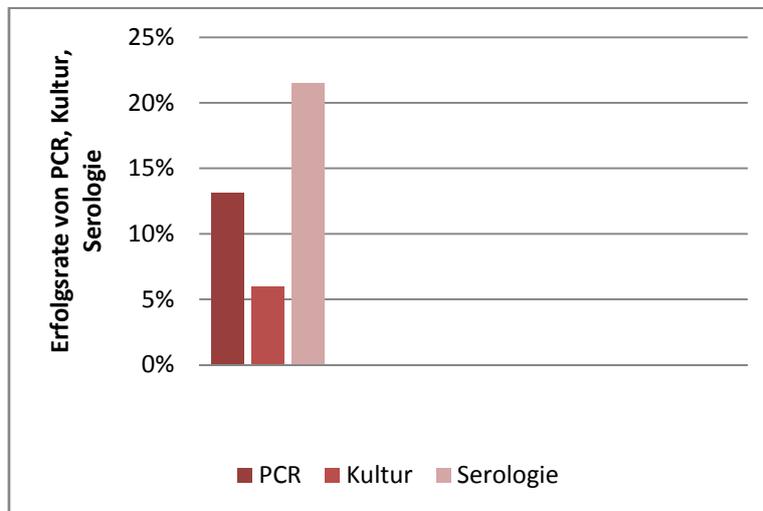


Abb. 3.5

### Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Negative Ergebnisse von PCR, Kultur und Serologie im Vergleich; bezogen auf 87 Untersuchungsmaterialien von Uveitis anterior-Patienten (Abbildung 3.6)

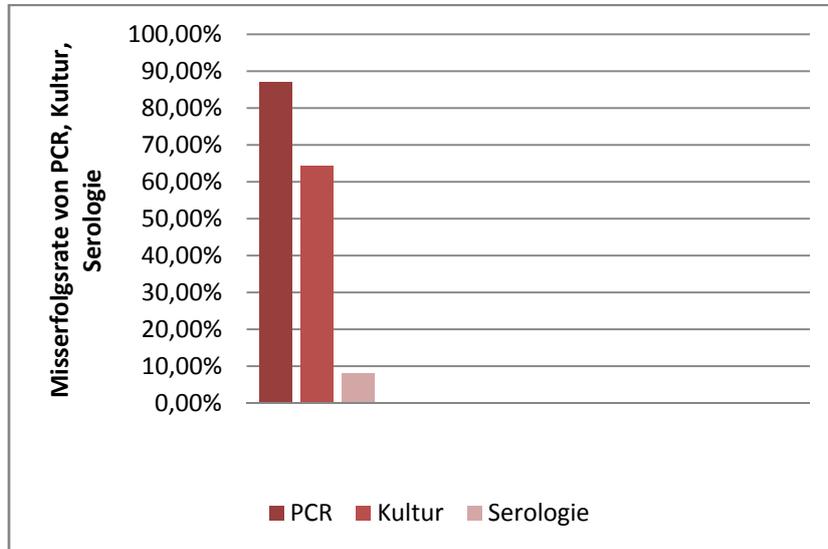


Abb. 3.6

### 3.4 Nachgewiesene Erreger

#### 3.4.1 Keratitis

##### 3.4.1.1 Kultureller Nachweis der Erreger

Insgesamt konnten durch Anzucht 18 Erreger nachgewiesen werden. Dabei ließen sich *Staphylococcus* spp. in 6 und *Pseudomonas* spp. in 5 Fällen identifizieren. *Candida*, *Streptococcus* spp., *Serratia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, Pneumokokken, *Propionibacterium acnes* und Enterokokken konnten bei jeweils einem Patienten bestimmt werden (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9

Erreger	Erregeranzahl	Anteil der einzelnen Erreger (Gesamtzahl: 18 Erreger)
<b>Bakterien</b>		
<i>Staphylococcus</i> spp.	6	33,3%
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	27,8%
<i>Streptococcus</i> spp.	1	5,6%
<i>Serratia</i>	1	5,6%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	5,6%
Pneumokokken	1	5,6%
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	5,6%
Enterokokken	1	5,6%
<b>Pilze</b>		
<i>Candida</i> spp.	1	5,6%
<b>Gesamt</b>	<b>18</b>	<b>100%</b>

##### 3.4.1.2 Serologischer Nachweis der Erreger

Bei 14 Patienten konnten Herpes-simplex-Viren (HSV) nachgewiesen werden. In einem Fall war das Varizella-zoster-Virus (VZV) das die Entzündung auslösende Pathogen. Insgesamt wurden 15 Erreger identifiziert (Tabelle 3-10).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Tabelle 3-10

Erreger	Erregeranzahl	Anteil der einzelnen Erreger (Gesamtzahl: 15 Erreger)
Viren		
HSV	14	93,3%
VZV	1	6,7%
<b>Gesamt</b>	<b>15</b>	<b>100%</b>

### 3.4.1.3 Nachweis der Erreger mit PCR

Bei 5 Patienten wurden mittels PCR *Pseudomonas* spp. nachgewiesen. Staphylokokken galten in 3 Fällen, Streptokokken in einem Fall als Auslöser der Entzündung. Bei jeweils 2 Patienten wurden Pneumokokken, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Candida* spp. nachgewiesen. Verursacher von 4 Keratitiden waren *Moraxella* spp.

*Serratia*, *Bartonella henselae* und *Aspergillus* waren jeweils für eine Entzündung verantwortlich. Bei 12 Patienten wurden mittels PCR Herpes-simplex-Viren (HSV) identifiziert (Tabelle 3-11).

Tabelle 3-11

Erreger	Erregeranzahl	Anteil der einzelnen Erreger (Gesamtzahl: 34 Erreger)
<b>Bakterien</b>		
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	14,7%
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	8,8%
<i>Streptococcus</i> spp.	1	2,9%
Pneumokokken	2	5,9%
<i>Moraxella</i> spp.	4	11,8%
<i>Serratia</i>	1	2,9%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	5,9%
<i>Bartonella henselae</i>	1	2,9%
<b>Pilze</b>		
<i>Aspergillus</i> spp.	1	2,9%
<i>Candida</i> spp.	2	5,9%
<b>Viren</b>		
HSV-1	12	35,3%
<b>Gesamt</b>	<b>34</b>	<b>100%</b>

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

### 3.4.1.4 Erregerspektrum bei Keratitis

Insgesamt konnten bei den Keratitis-Patienten 48 Erreger nachgewiesen werden. Das Spektrum der Pathogene ist folgender Tabelle zu entnehmen (Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12

Erreger	Erregeranzahl	Anteil der einzelnen Erreger (Gesamtzahl: 48 Erreger)
<b>Bakterien</b>		
Pseudomonas spp.	8	16,7%
Staphylococcus spp.	8	16,7%
Moraxella spp.	4	8,3%
Pneumokokken	2	4,2%
Stenotrophomonas maltophilia	2	4,2%
Streptococcus spp.	1	2,1%
Serratia	1	2,1%
Bartonella henselae	1	2,1%
Propionibacterium acnes	1	2,1%
Enterokokken	1	2,1%
<b>Pilze</b>		
Candida spp.	2	4,2%
Aspergillus spp.	1	2,1%
<b>Viren</b>		
HSV	15	31,3%
VZV	1	2,1%
<b>Gesamt</b>	<b>48</b>	<b>100%</b>

### 3.4.2 Uveitis anterior

#### 3.4.2.1 Kultureller Nachweis der Erreger

Mittels Kultur konnten 5 Erreger nachgewiesen werden. In einem Fall konnte das Pathogen nicht identifiziert werden. Bei 4 Patienten wurden Staphylococcus spp. bestimmt (Tabelle 3-13).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Tabelle 3-13

Erreger	Erregeranzahl	Anteil der einzelnen Erreger (Gesamtzahl: 5 Erreger)
Bakterien		
Staphylococcus spp.	4	80%
unbekannt	1	20%
<b>Gesamt</b>	<b>5</b>	<b>100%</b>

### 3.4.2.2 Serologischer Nachweis der Erreger

Serologisch konnten 18 Erreger bestimmt werden. Bei 12 Patienten wurden *Borrelia burgdorferi* identifiziert. Toxoplasmen galten in 2 Fällen als Auslöser einer Uveitis anterior. Uveitiden wurden bei 3 Patienten von Herpes-simplex-Virus (HSV) und bei einem Patienten von (Varizella-zoster-Virus (VZV) verursacht (Tabelle 3-14).

Tabelle 3-14

Erreger	Erregeranzahl	Anteil der einzelnen Erreger (Gesamtzahl: 18 Erreger)
Bakterien		
<i>Borrelia burgdorferi</i>	12	66,7%
Viren		
HSV	3	16,7%
VZV	1	5,6%
Parasiten		
<i>Toxoplasma gondii</i>	2	11,1%
<b>Gesamt</b>	<b>18</b>	<b>100%</b>

### 3.4.2.3 Nachweis der Erreger mit PCR

Die PCR war bei Uveitis anterior-Patienten in 11 Fällen positiv. Bei jeweils 2 Patienten wurden *Pseudomonas* spp., *Candida* spp. und *Toxoplasma gondii* nachgewiesen. Die Nukleinsäure von *Borrelia burgdorferi* und Varizella-zoster-Virus (VZV) wurde in jeweils einem Fall identifiziert. In 3 Fällen war eine Bestimmung des Erregers nicht möglich (Tabelle 3-15).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

**Tabelle 3-15**

<b>Erreger</b>	<b>Erregeranzahl</b>	<b>Anteil der einzelnen Erreger (Gesamtzahl: 11 Erreger)</b>
<b>Bakterien</b>		
Pseudomonas spp.	2	18,2%
Borrelia burgdorferi	1	9,1%
<b>Pilze</b>		
Candida spp.	2	8,2%
<b>Viren</b>		
VZV	1	9,1%
<b>Parasiten</b>		
Toxoplasma gondii	2	18,2%
unbekannt	3	27,3%
<b>Gesamt</b>	<b>11</b>	<b>100%</b>

### 3.4.2.4 Erregerspektrum bei Uveitis anterior

Insgesamt konnte bei 30 Uveitis anterior-Patienten ein Erreger nachgewiesen werden. Das dabei gefundene Erregerspektrum kann folgender Tabelle entnommen werden (Tabelle 3-16).

**Tabelle 3-16**

<b>Erreger</b>	<b>Erregeranzahl</b>	<b>Anteil der einzelnen Erreger (Gesamtzahl: 30 Erreger)</b>
<b>Bakterien</b>		
Pseudomonas spp.	2	6,7%
Staphylococcus spp.	4	15,3%
Borrelia burgdorferi	12	40%
<b>Pilze</b>		
Candida spp.	2	6,7%
<b>Viren</b>		
HSV	3	10%
VZV	1	3,3%
<b>Parasiten</b>		
Toxoplasma gondii	3	10%
unbekannt	3	10%
<b>Gesamt</b>	<b>30</b>	<b>100%</b>

## 4. Diskussion

### 4.1 Keratitis

Schon durch kleinste Verletzungen der Hornhaut können Pathogene ins Auge eindringen und zur Bildung einer Keratitis führen.

Das klinische Bild ist durch Ulcera im Stroma gekennzeichnet (Wilhelmus et al, 1994). Die betroffenen Patienten klagen häufig über Schmerzen und eine zunehmende Sehverschlechterung.

Der mikrobiologische Keimnachweis kann kulturell, serologisch und neuerdings auch mit einer molekularbiologischen Methode, der PCR erfolgen. Das Material hierfür wird durch Hornhautscraping oder Vorderkammerpunktat gewonnen. In der aktuellen Studie wurde bei 59 Patienten eine Hornhautbiopsie durchgeführt, wobei in 37 Fällen Pathogene nachgewiesen werden konnten. Kammerwasser aus der Vorderkammer wurde bei 28 Patienten entnommen. In 11 Fällen ist der Erregernachweis in diesem Untersuchungsmaterial geglückt.

Wegen der hohen Keimausbeute, sowie zur genaueren Keimdifferenzierung und Antibiotikatestung empfiehlt sich eine Anlage von Kulturen. Diese Standardmethode ist jedoch in ca. 40%-60% der Fälle negativ (Knox et al, 1998). In der aktuellen Studie an 87 Keratitis-Patienten konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, da in 60,9% der Fälle kein Erregernachweis mittels Kultur möglich war. Ein Grund dafür kann sein, dass vor Probenentnahme schon Antibiotika gegeben wurden und deshalb die Anzahl der Pathogene auf nicht mehr nachweisbare Werte gesunken war. Knox et al konnten an ihrer Institution in 40%-60% der Keratitis-Fälle positive Kulturergebnisse erzielen (Knox et al, 1998). Ähnliche Werte wurden auch in anderen amerikanischen Labors erreicht (Levey et al, 1997; O'Brien et al, 1995; Wahl et al, 1991; Pepose et al, 1996).

In unserer Studie war eine Anzüchtung in nur 20,5% der Fälle erfolgreich. Eine Ursache hierfür ist nicht ersichtlich. Da die Kultivierbarkeit eines Keimes artspezifisch ist, von der absoluten Keimzahl, der Vorschädigung des Keimes, sowie

### **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

eventuell vorhandenen wachstumshemmenden Faktoren abhängt, können diese Faktoren möglicherweise zu einem solch niedrigen positiven Kulturergebnis geführt haben.

Bei 17,6% der Keratitis-Patienten konnte in der aktuellen Studie ein Serologie-positives Ergebnis erzielt werden. Es handelte sich bei den nachgewiesenen Antikörpertitern nicht um Durchseuchungstiter, sondern um die Antikörper, die gegen die, die Entzündung auslösenden Erreger gerichtet sind. Diese Unterscheidung konnte anhand von den verschiedenen Antikörperklassen getroffen werden. Bei einem Durchseuchungstiter sind nur IgG-Antikörper nachweisbar, während bei einer akuten Entzündung IgM- und später auch IgG-Antikörper auftreten.

Zum Nachweis von extrem geringen Keimzahlen, also Bedingungen wie man sie gerade am Auge vorfindet, eignet sich vor allem die PCR. Diese molekularbiologische Methode ist auch besonders zur Anwendung bei Patienten geeignet, bei denen mit herkömmlichen Verfahren ein Nachweis des Keimes nicht möglich war oder die sich schon vor Entnahme des Probenmaterials einer Antibiotikabehandlung unterzogen hatten.

Zusammengefasst lässt sich das Grundprinzip der PCR folgendermaßen beschreiben: Die DNA von potentiellen Pathogenen wird aus dem Untersuchungsmaterial isoliert und mit Hilfe der PCR auf eine Anzahl vermehrt, die dann im Labor leicht nachgewiesen werden kann.

Lohmann et al konnten in einer klinischen Studie bei 16 Patienten die Erreger von Keratitiden in 15 von 16 Fällen mittels PCR bestimmen (Lohmann et al, 2000).

Neun (82%) von 11 Patienten mit bakterieller Keratitis waren in einer Studie von Knox et al PCR-positiv (Knox et al, 1998).

In der aktuellen Studie mit 87 Keratitis-Patienten war die PCR in 38,7% der Fälle erfolgreich. Die verschiedenen Werte der einzelnen Studien können aus den unterschiedlich großen Patientenzahlen resultieren, denn mit 87 Patienten wird

### Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

ein größeres Patientenspektrum abgedeckt als mit 16 oder 11 Patienten. Abweichungen werden bei großen Fallzahlen eher kompensiert.

Allen erwähnten Studien gemeinsam ist aber, dass sich die PCR als sensitivere mikrobiologische Methode als die Kultur erweist.

Bei der Befundinterpretation eines PCR-Ergebnisses ist immer zu beachten, dass die hohe Sensitivität der PCR auch zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. So ist es möglich, dass bei Gewinnung des Untersuchungsmaterials (Durchführung eines Hornhautscrapings oder Entnahme von Kammerwasser) periokuläre Erreger oder auch z.B. Normalflora der Haut dieses kontaminieren. Die PCR kann nicht zwischen dem auslösenden Keim und dieser Kontamination unterscheiden. Deshalb erfolgte die Gewinnung und Verarbeitung des Probenmaterials unter höchsten Reinheitsbedingungen. Um falsch negative Ergebnisse bei der PCR auszuschließen, wurden bei der Amplifikationsreaktion Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. In jedem Fall muss der mit der PCR erhobene Befund mit der Anamnese und Klinik abgeglichen werden.

In den folgenden Tabellen werden das Erregerspektrum aller infektiös bedingten Keratitiden weltweit und die in der aktuellen Studie nachgewiesenen Pathogene dargestellt (Tabellen 4-1 und 4-2).

Tabelle 4-1

	Erregerspektrum weltweit *
<b>Viren</b>	
Adenovirus	92%
Enterovirus	4%
HSV	4%
<b>Bakterien</b>	
Koagulasenegative Staphylokokken	10-40%
Staphylococcus aureus	10-15%
Andere grampositive Bakterien	5-10%
Gramnegative Bakterien	15-30% (-44%)
Mykobakterien, Parasiten, Pilze	<5%

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Tabelle 4-2

	Erregerspektrum der aktuellen Studie (auf 48 nachgewiesene Erreger bezogen)	Erregerspektrum der aktuellen Studie (auf 29 nachgewiesene Bakterien, 16 Viren und 3 Pilze bezogen)
<b>Viren</b>		
HSV	31,3%	93,8%
VZV	2,1%	6,3%
<b>Bakterien (gram-positiv)</b>		
Staphylococcus spp.	16,7%	27,6%
Moraxella spp.	8,3%	13,8%
Pneumokokken	4,2%	6,9%
Streptococcus spp.	2,1%	3,4%
Propionibacterium acnes	2,1%	3,4%
Enterokokken	2,1%	3,4%
<b>Bakterien (gram- negativ)</b>		
Pseudomonas spp.	16,7%	27,6%
Stenotrophomonas maltophilia	4,2%	6,9%
Serratia	2,1%	3,4%
Bartonella henselae	2,1%	3,4%
<b>Pilze</b>		
Candida spp.	4,2%	66,7%
Aspergillus spp.	2,1%	33,3%

Bemerkenswert ist, dass in der vorliegenden Studie die viral bedingten Keratitiden nicht durch Adenoviren ausgelöst wurden, welche weltweit als häufigste Erreger einer viralen Keratitis bekannt sind. Vielmehr waren Herpes-simplex-Viren (HSV) eine häufige Ursache von Keratitiden (31,3% aller Keratitis-Fälle). Enteroviren konnten in der aktuellen Studie nicht nachgewiesen werden. Die Angaben über die Häufigkeit von bakteriell bedingten Keratitiden, ausgelöst durch Staphylokokken (10-40%), stimmen mit unseren Ergebnissen (27,6%) überein. Andere grampositive Bakterien wie zum Beispiel Moraxella spp. (13,8%) waren in der aktuellen Studie etwas häufiger Auslöser bakterieller Keratitiden als in den weltweiten Angaben (5-10%). Die Häufigkeit von bakteriellen Keratitiden ausgelöst durch gramnegative Bakterien liegt im Bereich der allgemeinen Häufigkeit (15-44%). Pilze sind auch in dieser Arbeit die seltensten Verursacher einer Keratitis. Unterschiede in der Erregerverteilung können aus der geringeren Patientenzahl (n=87) der aktuellen Studie gegenüber dem weltweit erfassten Erregerspektrum resultieren. Auch sind regionale Unterschiede in der Erregerverteilung als Ursache denkbar.

### Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Lohmann et al konnten in ihrer Studie an 16 Keratitis-Patienten in 15 Fällen den Erreger mittels PCR nachweisen. *Pseudomonas aeruginosa* konnten bei 4 Patienten mit akuter Keratitis mit PCR und Kultur bestimmt werden. In jeweils 3 Fällen konnten HSV und *Moraxella catarrhalis* isoliert werden. *Borrelia burgdorferi* und VZV wurden bei jeweils zwei Patienten mittels PCR nachgewiesen. Der Auslöser einer Keratitis war *Bartonella henselae*. Mittels Kultur konnten daneben nur noch zwei weitere Erreger, nämlich *Moraxella catarrhalis* bestimmt werden (Lohmann et al, 2000).

In einer Studie von Knox et al waren *Staphylococcus* spp. der dominierende Auslöser von bakteriellen Keratitiden. Diese wurden in 8 von 11 Fällen mittels PCR nachgewiesen. Bei wiederum 8 Patienten konnten Staphylokokken auch mittels Kultur bestimmt werden (Knox et al, 1998).

Das Erregerspektrum der aktuellen Studie ist in etwa deckungsgleich mit dem der früheren Studien. Jedoch wurden bei uns aufgrund der größeren Patientenzahl auch seltenere Erreger nachgewiesen. Die PCR war bei 34 Patienten erfolgreich. In 5 Fällen wurden *Pseudomonas* spp. nachgewiesen, die auch mittels Kultur identifiziert werden konnten. *Candida*, Pneumokokken und *Stenotrophomonas maltophilia* konnten mit der PCR in jeweils 2 Fällen, mit Kultur in jeweils einem Fall nachgewiesen werden. Bei 12 Keratitis-Patienten konnte HSV mittels PCR bestimmt werden. Die Serologie konnte das Virus in 14 Fällen nachweisen. VZV wurde bei einem Patienten mittels Serologie als verursachendes Pathogen identifiziert. Staphylokokken ließen sich bei 6 Patienten anzüchten und in 3 Fällen mittels PCR bestimmen. Die Nukleinsäure von *Moraxella* spp. wurde viermal amplifiziert. *Streptococcus* spp., *Serratia*, *Propionibacterium acnes* und Enterokokken wurden je einmal mittels Kultur identifiziert. *Streptococcus* spp., *Serratia*, *Bartonella henselae* und *Aspergillus* konnte man bei je einem Patienten mit PCR nachweisen.

Die ähnlichen Erfolgsquoten von Kultur (20,5%) und Serologie (17,6%) spiegeln die Tatsache wieder, dass Keratitiden sowohl von Bakterien als auch von Viren ungefähr im gleichen Verhältnis ausgelöst werden.

### **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

Zusammenfassend ist die PCR ein wichtiges Instrument zur mikrobiologischen Diagnostik einer Keratitis. Es dürfen aber auch die herkömmlichen Methoden nicht außer acht gelassen werden, da man durch Anlage einer Kultur Antibio-gramme erstellen kann, die es möglich machen, eine noch gezieltere Therapie einzuleiten.

## 4.2 Uveitis anterior

Da bei einer Uveitis anterior Visusverschlechterungen auftreten können, ist eine rasche und genaue Diagnosestellung und ein schnellstmöglicher Therapiebeginn von sehr großer Bedeutung. Die Möglichkeiten einer mikrobiologischen Diagnostik bestehen in herkömmlichen Verfahren wie Kultur und Serologie sowie auch in neueren Methoden wie der PCR.

Das klinische Bild der Uveitis anterior ist durch das Vorhandensein von Entzündungszellen in der Vorderkammer und ein mögliches Hypopyon gekennzeichnet. Weiterhin findet man eine Zunahme der Proteinmasse im Kammerwasser. Das klinische Bild wird begleitet von Rötungen, Schmerzen, Photophobie und herabgesetzter Sehkraft (Smith, Nozik, 1989)

Untersuchungsmaterial wird standardmäßig entweder durch eine Vorderkammerpunktion oder durch Vitrektomie (Glaskörperaspirat) gewonnen (Thurau, 2003). In der aktuellen Studie wurde bei 70 Patienten eine Vorderkammerpunktion durchgeführt, und es konnte in diesem Material in 23 Fällen ein Erreger nachgewiesen werden. Bei 14 Patienten wurde Glaskörpermaterial entnommen, wobei aus diesem in 7 Fällen ein Erreger isoliert werden konnte.

Zur genauen Differenzierung und Sensibilitätstestung der Bakterien gegenüber Antibiotika ist eine Anlage von Kulturen sinnvoll. In unserer Studie war die Anzucht in 6% der Fälle erfolgreich. Dieses geringe positive Ergebnis resultiert daraus, dass Viren und Parasiten, die mittels Serologie nachgewiesen werden, häufige Verursacher von Uveitiden sind. Das stimmt auch mit dem Serologie-Ergebnis überein, das mit 21,5% deutlich über dem Kultur-Ergebnis liegt.

Bornand und de Gottrau führten eine klinische Studie an 90 Patienten durch. Ziel war es die anhand der Klinik gestellte Diagnose einer okulären Toxoplasmose mikrobiologisch nachzuweisen. Die Serologie lieferte in 41,1% der Fälle (37 Patienten) ein positives Ergebnis. In 12 Fällen (13,3%) war das Ergebnis unklar. Bei 41 Patienten (45,6%) fand sich mittels Serologie kein Hinweis auf ein Pathogen (Bornand, de Gottrau, 1997). Trotz ähnlicher Größe der Patientengruppe (84 Uveitis anterior- Patienten in der aktuellen und 90 Patienten in

### **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

der Studie von 1997) schnitt unsere Studie mit 21,5% auf den ersten Blick schlechter ab. Zu beachten ist aber, dass Bornand und de Gottrau die serologischen Untersuchungen nur an Patienten mit potentieller Toxoplasmose durchführten. Die aktuelle Studie hingegen machte keine Einschränkungen hinsichtlich des Erregerspektrums der Patienten.

Bei serologischen Untersuchungen ist immer zu beachten, dass für eine aussagekräftige Bestimmung des Antikörpertiters sowohl eine Untersuchung des peripheren Blutes als auch des Kammerwassers notwendig ist. Erst dann lässt sich der für die Beurteilung des Ergebnisses wichtige Goldmann-Witmer-Koeffizient bestimmen.

Die PCR, eine molekularbiologische Nachweismethode, ist für die Bedingungen, die bei Entzündungen am Auge vorliegen, nahezu optimal. Das geringe Volumen der Untersuchungsmaterialien, das entsprechend wenige Pathogene enthält, bedarf einem sehr empfindlichen Verfahren. Die Nukleinsäure der im Probenmaterial vorhandenen Erreger wird mit Hilfe eines Enzyms amplifiziert und kann dann im Labor nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie wurden 84 Patienten mit Uveitis anterior untersucht. In 13,1% der Fälle war die PCR positiv. Die Serologie war bei 21,5% der Patienten erfolgreich. Da die Uveitis anterior häufig idiopathisch bedingt ist, finden sich sowohl in der aktuellen Studie als auch in der Studie von Bornand und de Gottrau (8%) ähnlich wenige positive Nachweise mit Hilfe der PCR.

Die vielen negativen Ergebnisse der mikrobiologischen Verfahren lassen sich dadurch erklären, dass bei Patienten mit Uveitis die eigentliche Ursache der Entzündung oft ungeklärt bleibt oder nicht-erregerbedingte Formen der Uveitis im Rahmen einer Systemerkrankung wie Sarkoidose auftreten.

Virale Uveitiden werden am häufigsten durch Paramyxoviridae (insbesondere Morbilli-Viren), Herpes-simplex-Viren (HSV), Varizella-zoster-Viren (VZV) und seltener durch Epstein-Barr-Viren (EBV) verursacht. In der aktuellen Studie konnten bei 84 Patienten 30 Erreger identifiziert werden. HSV machte 10% und VZV nur 3,3% der Pathogene aus.

### Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Yersinia spp., Borrelia burgdorferi und Treponema pallidum gelten als Auslöser bakterieller Uveitiden.

Borrelien (40% der Erreger) verursachten in dieser Studie die meisten der Entzündungen. Das liegt wohl daran, dass der Raum Regensburg/Passau zu den Zeckenballungszentren Deutschlands gehört. Weiterhin wurden Pseudomonas (6,7%) und Staphylococcus spp. (13,3%) isoliert.

Eine Infektion mit Candida spp., die als Ursache fungaler Uveitiden angesehen wird, machte in der aktuellen Studie 6,7% der Fälle aus. Toxoplasmen (10% der Erreger) lösten parasitäre Uveitiden aus. In 10% der Fälle konnte der Erreger nicht identifiziert werden (Tabelle 4-3).

**Tabelle 4-3**

	Erregerspektrum der aktuellen Studie (auf 30 nachgewiesene Erreger bezogen)
<b>Viren</b>	
HSV	10,0%
VZV	3,3%
<b>Bakterien (gram-positiv)</b>	
Staphylococcus spp.	13,3%
<b>Bakterien (gram-negativ)</b>	
Borrelia burgdorferi	40,0%
Pseudomonas spp.	6,7%
<b>Pilze</b>	
Candida spp.	6,7%
<b>Parasiten</b>	
Toxoplasma gondii	10,0%
unbekannt	10,0%

Offt ist die Uveitis anterior auch Folge einer systemischen Erkrankung.

Dies fanden McCannel et al unter anderem in einer Studie mit Patienten, die an Uveitis erkrankt waren und in sog. „community-based ophthalmology practice“ und „tertiary referral centers“ behandelt wurden, heraus. Weiterhin stellten sie

### **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

fest, dass innerhalb ihrer Patientengruppe in „community-based ophthalmology practice“ VZV-Uveitiden 4% der Fälle ausmachten (McCannel et al, 1996). Dies stimmt mit der von uns gefundenen Zahl (3,3%) in etwa überein. Die Uveitiden von Patienten, die in „ tertiary referral centers“ behandelt wurden, waren in 5% der Fälle durch HSV bedingt. In der aktuellen Studie, in welcher die Patienten nicht primär an einer systemischen Erkrankung leiden, wurde eine Zahl von 10% gefunden.

Die PCR erreichte bei der mikrobiologischen Diagnostik einer Uveitis anterior im Vergleich zur Serologie weniger Erfolgsquoten, ist jedoch schon alleine wegen der schnellen Durchführbarkeit von großem diagnostischem Wert.

## 5. Zusammenfassung

Bei Patienten, die an einer Uveitis anterior erkrankt waren, konnte in der aktuellen Studie mit serologischen Nachweisverfahren ein besseres mikrobiologisches Ergebnis erreicht werden als mit der PCR. Diese war in nur 13,1% der Fälle positiv, während die Serologie in 21,5% der Fälle ein positives Ergebnis lieferte. Eine Ursache für das niedrige PCR-Ergebnis ist nicht erkennbar.

In dieser Studie konnten bei den Keratitis-Patienten mit dem PCR-Nachweis die besten Erfolge erzielt werden (38,7%). Kultur und Serologie waren mit 20,5% und 17,6% weniger erfolgreich.

Beim Vergleich mit früheren Studien fällt auf, dass diese oft eine deutlich geringere Patientenzahl aufwiesen und deshalb weniger aussagekräftig sind.

Die für Uveitis anterior und Keratitis beschriebenen Erregerspektren in der aktuellen Studie konnten im Vergleich mit Ergebnissen aus der Literatur und aus früheren Studien bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PCR trotz guter Ergebnisse beim Erregernachweis einer Keratitis immer in Kombination mit den herkömmlichen Verfahren eingesetzt werden sollte, um die Vorteile jeder einzelnen Methode zu nutzen und Nachteile besser ausgleichen zu können.

## 6. Schlussfolgerung

In den letzten Jahren hat sich die PCR bei Entzündungen der vorderen Augenabschnitte zu einer wesentlichen Ergänzungsmethode zu den herkömmlichen Nachweisverfahren wie Mikroskopie, Kultur und Serologie entwickelt.

Die PCR schafft es zum einen, sehr kleine Erregermengen in kurzer Zeit nachzuweisen sowie Erreger zu bestimmen, die mit herkömmlichen Methoden nicht zu identifizieren sind.

Der Nachweis der Pathogene mit Hilfe des Mikroskops erfolgt zwar auch in kurzer Zeit, jedoch ist eine sehr hohe Zahl von Erregern notwendig, um ein positives Ergebnis zu erzielen. Darüberhinaus kann die Mikroskopie nur Hinweise auf das Aussehen der Erreger liefern, was bedeutet, dass Identifizierungen immer einen großen subjektiven Anteil beherbergen.

Als großer Vorteil der Kultur ist sicherlich die damit mögliche Resistenztestung zu nennen, die es möglich macht, eine gezieltere Antibiotikabehandlung einzusetzen. Dies spielt vor allem im klinischen Alltag eine entscheidende Rolle. Jedoch ist die kulturelle Anzucht ein Verfahren, welches vergleichsweise lange dauert bis ein eindeutiger Nachweis erfolgen kann (ca. 24 h). Desweiteren stößt die Kultur bei nicht oder schwer anzüchtbaren Erregern an ihre Grenzen.

Mit Hilfe von serologischen Methoden können akute und chronische Infektionen sowie Durchseuchungstiter bestimmt werden. Diese Form der Pathogenbestimmung erfolgt ähnlich rasch wie der Nachweis durch Mikroskopie oder PCR, jedoch führt die besondere immunologische Stellung des Auges zu einer Minderung der Aussagekraft.

Im klinischen Alltag sollte eine Kombination der herkömmlichen Methoden zusammen mit der PCR erfolgen. Auf die kulturelle Anzucht mit der Antibiotikates- tung und der anschließenden Erstellung von Antibiogrammen kann genauso wenig verzichtet werden wie auf die durch serologische Methoden nachgewie- senen Durchseuchungstiter des Patienten.

### **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

Um ein optimales Zusammenspiel von benötigter Schnelligkeit, Sensitivität und Spezifität des Erregernachweises zu erreichen, ist es von großer Wichtigkeit, die herkömmlichen Methoden als auch die PCR im Kontext zu sehen. Abgerundet wird dieses Zusammenspiel durch das klinische Bild des Patienten, das bei der Diagnosestellung ebenso einen wichtigen Platz einnehmen sollte.

Die PCR hat sich in den letzten Jahren als sehr sensitive Methode entwickelt. Es ist zu erwarten, dass diese Form des Erregernachweises in den kommenden Jahren als „Standard“ eingesetzt wird.

## Anhang

### Statistische Auswertung:

Positive Ergebnisse der mikrobiologischen Nachweisverfahren in ihrer Übersicht

Tabelle 7-1

	PCR+	Kultur+	Serologie+
Keratitis	38,7%	20,5%	17,6%
Uveitis anterior	13,1%	6,0%	21,5%

### Signifikanzen

Diese wurden mit dem „exakten Test nach McNemar“ berechnet. Der Test basiert auf einer 2x2 Matrix (Kontingenztafel, Vierfeldertafel).

Tabelle 7-2

	B+	B-
A+	n++	n+-
A-	n-+	n--

„A“ und „B“ beschreiben die mikrobiologischen Verfahren (PCR, Kultur, Serologie), die angewendet wurden. „+“ bzw. „-“ beschreibt jeweils, ob der Erregernachweis mit der jeweiligen Methode erfolgreich war oder nicht. „n“ beschreibt die Patientenzahl (Tabelle 7-2).

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Nullhypothese (nach Möglichkeit abzulehnen): „Altes Verfahren (Kultur, Serologie) hat eine höhere Erfolgswahrscheinlichkeit das Pathogen nachzuweisen als neues Verfahren (PCR).“

### Keratitis

#### Übersicht:

**Tabelle 7-3**

PCR+ Kultur+	PCR+ Kultur-	PCR- Kultur+	PCR- Kultur-	PCR+ Serologie+	PCR+ Serologie-	PCR- Serologie+	PCR- Serologie-
8	14	10	39	11	1	4	0

#### Test nach McNemar:

**Tabelle 7-4**

	Kultur+	Kultur-
PCR+	8	14
PCR-	10	39

p-Wert: 0,270

Man nimmt eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,270 in Kauf, wenn man die Hypothese ablehnt, dass Erfolgswahrscheinlichkeit (PCR) < Erfolgswahrscheinlichkeit (Kultur).

Entsprechend nimmt man eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $1 - 0,270 = 0,730$  in Kauf, wenn man die Hypothese ablehnt, dass die Erfolgswahrscheinlichkeit (PCR) > Erfolgswahrscheinlichkeit (Kultur).

=> keine 1-promill-, keine 1-prozent, keine 5-prozent-signifikante Aussage möglich

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

**Tabelle 7-5**

	Serologie+	Serologie-
PCR+	11	1
PCR-	4	0

p-Wert: 0,969

Man nimmt eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,969 in Kauf, wenn man die Hypothese ablehnt, dass Erfolgswahrscheinlichkeit (PCR) < Erfolgswahrscheinlichkeit (Serologie).

Entsprechend nimmt man eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $1-0,969=0,031$  in Kauf, wenn man die Hypothese ablehnt, dass die Erfolgswahrscheinlichkeit (PCR) > Erfolgswahrscheinlichkeit (Serologie).

=> keine 1-promill- und keine 1-prozent-signifikante Aussage möglich

=> letzte Aussage zu 5-prozent-Signifikanzniveau gesichert

### **Uveitis anterior**

#### Übersicht:

**Tabelle 7-6**

PCR+ Kultur+	PCR+ Kultur-	PCR- Kultur+	PCR- Kultur-	PCR+ Serologie+	PCR+ Serologie-	PCR- Serologie+	PCR- Serologie-
1	6	4	48	3	1	15	6

## Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior

Test nach McNemar:

Tabelle 7-7

	Kultur+	Kultur-
PCR+	1	6
PCR-	4	48

p-Wert: 0,377

Man nimmt eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,377 in Kauf, wenn man die Hypothese ablehnt, dass Erfolgswahrscheinlichkeit (PCR) < Erfolgswahrscheinlichkeit (Kultur).

Entsprechend nimmt man eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $1-0,377=0,623$  in Kauf, wenn man die Hypothese ablehnt, dass die Erfolgswahrscheinlichkeit (PCR) > Erfolgswahrscheinlichkeit (Kultur).

=> keine 1-promill-, keine 1-prozent, keine 5-prozent-signifikante Aussage möglich

Tabelle 7-8

	Serologie+	Serologie-
PCR+	3	1
PCR-	15	6

p-Wert: 1,000

Man nimmt eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 1,000 in Kauf, wenn man die Hypothese ablehnt, dass Erfolgswahrscheinlichkeit (PCR) < Erfolgswahrscheinlichkeit (Serologie).

### **Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

Entsprechend nimmt man eine Fehlerwahrscheinlichkeit von nahezu 0 in Kauf, wenn man die Hypothese ablehnt, dass die Erfolgswahrscheinlichkeit (PCR) > Erfolgswahrscheinlichkeit (Serologie).

=> Aussage zu 1-promill-Signifikanzniveau gesichert

## Literaturverzeichnis

- (1) Becker MD, Bodaghi B, Holz FG, Harsch N, Le Hoang P (2003) *Diagnostische Vitrektomie bei Uveitis*. Ophthalmologie 100:796-801
- (2) Bialasiewicz AA (1996) *Mikrobiologische Aspekte der Kontaktlinsenpraxis*. Contactologia 18:201-204
- (3) Bloch-Michel E, Nussenblatt RB (1987) *International uveitis study group recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease*. Am J Ophthalmol 103:234-235
- (4) Bornand JE, de Gottrau P (1997) *Uveitis: is ocular toxoplasmosis only a clinical diagnosis?* Ophthalmologica, 211:87-89
- (5) Ehrlich HA, Gelfant D, Sninski JJ (1991) *Recent advances in the polymerase chain reaction*. Science 252:1643-1651
- (6) Foster CS, Vitale AT. *Diagnosis and treatment of uveitis*. 1. Auflage, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2002; 21-25
- (7) Hahn H, Falke D, Klein P. *Medizinische Mikrobiologie*. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994; 233-234, 236, 242
- (8) Knox CM, Cevallos V, Dean D (1998) *16S ribosomal DNA typing for identification of pathogens in patients with bacterial keratitis*. Journal of Clinical Microbiology 12:3492-3496
- (9) Levey SB, Katz HR, Abrams DA, Hirschbein MJ, Marsh MJ (1997) *The role of cultures in the management of ulcerative keratitis*. Cornea 16:383-386
- (10) Lohmann CP, Winkler von Mohrenfels C, Gabler B, Reischl U, Kochanowski B (2000) *Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur mikrobiologi-*

**Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

*schen Diagnostik einer persistierenden infektiösen Keratitis: Eine klinische Studie bei 16 Patienten.* Klin Monatsbl Augenheilkd 217:37-42

- (11) McCannel CA, Holland GN, Helm CJ, et al (1996) *Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology.* Am J Ophthalmol 121:35-46
- (12) O'Brien TP, Maguire MG, Fink NE, Alfonso E, McDonnell P (1995) *Efficacy of ofloxacin vs. cefazolin and tobramycin in the therapy of bacterial keratitis. Report from the bacterial keratitis study research group.* Arch Ophthalmol 113:1257-1265
- (13) Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR (ed.). *Ocular infection and immunity.* Mosby Year Book Inc., St. Louis, Mo, 1996; 970-1031
- (14) Reischl U (2003) *Vorlesung Medizinische Mikrobiologie. Teil 2: Bakteriologie, Pilze, Parasiten. Materialien. Molekularbiologische Diagnostik (PCR).* Skript 8:1-10
- (15) Reischl U, Lohmann CP (1997) *Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ihre Anwendungsmöglichkeiten zur infektiologischen Diagnostik in der Ophthalmologie.* Klin Monatsbl Augenheilkd 211:227-234
- (16) Reischl U, Mayer J (1993) *Moderne Methoden der Nukleinsäure-Diagnostik.* Lab med 17:456-464
- (17) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) *Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science 230:1350-1354
- (18) Smith RE, Nozik RA. *Uveitis. A clinical approach to diagnosis and management.* Williams and Wilkins, Baltimore, 1989; 15-20

**Stellenwert der PCR zur Diagnostik von Keratitis und Uveitis anterior**

- (19) Thureau S (2003) *Praktische Hinweise zur Gewinnung und erfolgreichen Aufbereitung von Vorderkammerpunktat und Vitrektomiematerial*. Ophthalmologie 100:802-807
- (20) Wahl JC, Katz HR, Abrams DA (1991) *Infectious keratitis in Baltimore*. Ann Ophthalmol 23:237-243
- (21) Wilhelmus KR, Liesegang TJ, Osato MS, Jones DB. Cumitech 13A. *Laboratory diagnosis of ocular infections*. Coordinating ed., Specter SC. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1994; 15
- (22) Witting H. *Mathematische Statistik I*. Teubner, Stuttgart, 1985; 385

## Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. Chris P Lohmann für die Überlassung des Themas und die ständige Betreuung und Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit danken.

Danken möchte ich auch Prof. Udo Reischl und den Mitarbeitern der Mikrobiologie für ihre Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. med. Christoph Winkler von Mohrenfels für seine Ratschläge.

Für ihre stetige, freundliche Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Fragen danke ich Frau Botzler in Regensburg und Frau Schmelzer in München.

Den Damen der Leitstelle Augenheilkunde in Regensburg gilt ebenso mein Dank.

## Curriculum vitae

Name: Köhleln

Vorname: Sophie

Anschrift: Stolzingstr. 151g  
95445 Bayreuth

Geburtsdatum: 05.03.1982

Geburtsort: Bayreuth

Familienstand: ledig

Eltern: Norbert Köhleln, Industrie- und  
Handelskaufmann  
Luise Köhleln, Hausfrau

Geschwister: keine

Schulbildung: 1988-1992: Grundschule Jean-  
Paul, Bayreuth  
1992-2001: Markgräfin-  
Wilhelmine-Gymnasium, Bay-  
reuth

Studium: seit Wintersemester 2001 Stu-  
dium der Humanmedizin an der  
Universität Regensburg  
Ärztliche Vorprüfung September  
2003  
Zweiter Abschnitt der ärztlichen  
Prüfung November 2007