

Pilzkontaminationen in Korneatransplantaten

Effektivität antimykotischer Medienzusätze und Anwendbarkeit molekularbiologischer Detektionsmethoden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Isabel Maria Rehbach

aus Aachen

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding
2. Gutachter: Prof. Dr. Steffen Engelhart

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.07.2023

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie

Direktor: Prof. Dr. Achim Hörauf

sowie dem Paul-Ehrlich-Institut, Langen

Präsident: Prof. Dr. Klaus Cichutek

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1	Einleitung	8
1.1	Pilze	8
1.1.1	Pilze als humanpathogene Erreger	9
1.1.2	<i>Candida spp.</i>	10
1.2	Korneatransplantation	13
1.2.1	Anatomie und Funktion der Kornea	13
1.2.2	Indikationen und Varianten der Keratoplastik	14
1.2.3	Gewinnung und Lagerung von Spenderhornhäuten	15
1.2.4	Infektionen nach Keratoplastik	18
1.2.4.1	Bakterielle Kontaminanten	18
1.2.4.2	Pilzkontaminationen als zunehmende Gefahr	19
1.2.5	Mikrobiologische Testung von Korneatransplantaten	21
1.3	Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material und Geräte	23
2.1.1	Nährmedien, Medienzusätze, Puffer und Chemikalien	23
2.1.2	Antimykotika für MHK-Bestimmungen	24
2.1.3	Molekularbiologische Enzyme, Reagenzien und gebrauchsfertige Kits	24
2.1.4	Pilzstämmen	26
2.1.5	Klinisches Probenmaterial	26
2.1.6	Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	27
2.1.7	Computerprogramme	30
2.2	Methoden	30
2.2.1	Kultivierung der untersuchten Pilzstämmen	30
2.2.2	Keimzahlbestimmung	31
2.2.3	Sterilitätstestung im Kulturautomaten	31
2.2.4	Methoden der Resistenzbestimmung	32
2.2.5	Herstellung des Kornealagerungsmediums	34
2.2.6	Versuchsaufbau der Kontaminationsversuche mit <i>Candida-spp.</i> in Kornealagerungsmedium	35
2.2.7	Versuchsaufbau zur Identifizierung potenzieller Interaktionen zwischen Antimykotika und Kulturautomaten	37
2.2.8	Molekularbiologische Methoden	38

2.2.8.1	DNA-Isolation	38
2.2.8.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.2.8.3	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.8.4	Quantitative Real-time PCR (qPCR)	43
2.2.8.5	Nanoporen-Sequenzierung	45
2.2.9	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Resistenzbestimmung verschiedener <i>Candida</i> -Stämme gegen Amphotericin B und Fluconazol	49
3.2	Kontaminationsversuche mit <i>Candida spp.</i> in Kornealagerungsmedium	53
3.2.1	Bioburdenreduktion durch 2.5 µg/ml Amphotericinzusatz in experimentell mit <i>C. albicans</i> versetztem Kornealagerungsmedium	53
3.2.2	Bioburdenreduktion durch niedrigere Amphotericin B-Konzentrationen (0,25 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5, µg/ml) in experimentell mit <i>C. albicans</i> versetztem Kornealagerungsmedium	57
3.2.3	Bioburdenreduktion durch 2.5 µg/ml Amphotericinzusatz in experimentell mit <i>C. auris</i> versetztem Kornealagerungsmedium	61
3.3	Identifizierung von potenziellen Beeinträchtigungen der mikrobiologischen Testung im Kulturautomaten durch Antimykotika	63
3.4	Nachweis von Pilzkontaminationen durch nukleinsäurebasierte Methoden als Alternative zur mikrobiologischen Testung	65
3.4.1	Erprobung des Nachweises von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	65
3.4.2	Nachweis von Pilzkontaminationen in klinischen Kornealagerungsmedium-Proben mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	69
3.4.3	Nachweis von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)	72
3.4.4	Nachweis von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium durch „Next-Generation-Sequencing“ (NGS)	73
4	Diskussion	76
4.1	Zusatz von Antimykotika in Kornealagerungsmedien	77
4.1.1	Bioburdenreduktion bei Zusatz von 2,5 µg/ml Amphotericin B zu Kornealagerungsmedien in hypothermer Lagerung und Organkultur	77
4.1.2	Bioburdenreduktion bei Verwendung abweichender Amphotericin B-Konzentrationen	79
4.1.2.1	Verschiedene Amphotericinkonzentrationen in hypothermer Lagerung	79
4.1.2.2	Verschiedene Amphotericinkonzentrationen unter Organkulturbedingungen	83
4.2	Auswirkungen von Antimykotika in Kornealagerungsmedium auf die Detektion in Kulturautomaten	84

4.2.1	Bedeutung anaerober Kulturflaschen bei der Detektion von Kontaminanten in Kornealagerungsmedium	87
4.3	Toxisches Potenzial von antimykotischen Zusätzen in Kornealagerungsmedium	88
4.4	Die Rolle anderer Antimykotika sowie weiterer Ansätze zur Dekontamination von Korneatransplantaten	89
4.5	Die Rolle molekularbiologischer Nachweismethoden in der klinischen Diagnostik	90
4.5.1	DNA-Isolation aus Pilzen bzw. aus Kornealagerungsmedium	92
4.5.2	PCR zur Testung von Kornealagerungsmedium	94
4.5.3	Quantitative PCR (qPCR) zur Testung von Kornealagerungsmedium	96
4.5.4	Sequenzierung von Proben aus Kornealagerungsmedium	96
4.6	Limitationen und anknüpfende Fragestellungen	99
5	Zusammenfassung	102
6	Anhang	104
7	Abbildungsverzeichnis	106
8	Tabellenverzeichnis	109
9	Literaturverzeichnis	111
10	Danksagung	129

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Ct	Cycle Threshold
d	Tage
DALK	Deep Anterior Lamellar Keratoplasty
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMEK	Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSAEK	Descemet Stripping Automated Endothelial Keraoplasty
DSMZ	DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBAA	Eye Bank Association of America
E-Test	Epsilometerest
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FCS	Fetales Kälberserum
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffersubstanz
ISO	International Organization for Standardization
ITS	Internal transcribed spacer
KBE	Koloniebildende Einheit
Kontr.	Kontrolle
l	Liter
log	Logarithmus

M	Mittelwert
MEM	Minimal Essential Medium
MHK/MIC	dt.: Minimale Hemmkonzentration, engl.: Minimal inhibitory concentration
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, Puffersubstanz
NAT	Nukleinsäureamplifikationstechnik
NC	Negativkontrolle
neg.	negativ
ng	Nanogramm
NGS	Next-Generation-Sequencing
NTC	Non-template-control
PCR	Polymerasekettenreaktion
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia, Europäisches Arzneibuch
PK, PC	Positivkontrolle
pos.	positiv
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
rcf	Relative Centrifugal Force
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
s	Sekunden
t ₁ , t ₂ , t ₃ , etc.	Zeitpunkt 1, Zeitpunkt 2, Zeitpunkt 3, etc.
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
U	Unit, Enzymeinheit

1 Einleitung

Korneatransplantationen gehören zu den am häufigsten durchgeführten Transplantationen überhaupt. In Deutschland werden jährlich circa 7.000 dieser Eingriffe, auch Keratoplastiken genannt, durchgeführt, weltweit sind es über 180.000 (Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation, 2019; Flockerzi et al., 2018; Gain et al., 2016). Da die Kornea (Synonym: Augenhornhaut) ein nicht durchblutetes Gewebe ist, sind Abstoßungsreaktionen im Vergleich zu Organtransplantationen deutlich seltener und die Erfolgsaussichten einer Transplantation hoch. So kann eine Korneatransplantation unter anderem für Patienten mit angeborenen Veränderungen der Kornea oder erworbenen Verletzungen eine wichtige Therapieoption sein.

Zu den wichtigsten Komplikationen einer Keratoplastik zählen je nach Transplantationsmethode neben Abstoßungsreaktionen, Dislokation des Transplantats und Endothelzellversagen vor allem postoperative Infektionen. Dabei wurde in den letzten Jahren ein Anstieg der Inzidenz an postoperativen Infektionen durch Pilze festgestellt (Edelstein et al., 2016). Die Ursachen dieses Trends sind Gegenstand aktueller Diskussionen in Fachkreisen. Umstritten ist vor allem der Einfluss der Aufbewahrungsmethode der Spenderhornhäute auf Kontaminationsraten und dabei im Speziellen die Relevanz antimykotischer Zusätze im Aufbewahrungsmedium. Aber auch neue Operationstechniken, besonders der Anstieg lamellärer Keratoplastiken im Verhältnis zu perforierenden Keratoplastiken, werden als mögliche Gründe für die steigende Anzahl von postoperativen Pilzinfektionen diskutiert (Aldave et al., 2013; Brothers et al., 2017; Flockerzi et al., 2018).

1.1 Pilze

Pilze sind eukaryotische Organismen mit vielgestaltigem Erscheinungsbild. Ihr Vorkommen in der Umwelt ist ubiquitär, jedoch ist nur ein sehr geringer Anteil der Pilze unter medizinischen Gesichtspunkten relevant.

Charakteristisch für den Aufbau von Pilzzellen sind die stabile Zellwand aus Chitin, Glukan und Mannan, sowie die Zellmembran, die bei den meisten Pilzen Ergosterol anstelle von Cholesterol enthält (Haase, 2016b). Diese Charakteristika sind auch wesentliche

Angriffspunkte antimykotischer Therapeutika (Haase, 2016a). Pilze ernähren sich heterotroph. Sie sezernieren Exoenzyme, lösen so Nährstoffe aus dem sie umgebenden Material und nehmen die Abbauprodukte anschließend auf. Bei der Fortpflanzung kommen sowohl sexuelle als auch asexuelle Formen vor. Auch die Morphologie variiert stark und umfasst fadenartige Zellverbände (Hyphen) sowie Sprosszellen (Hefen) (Kothe, 2017).

Die biologische Systematik der Pilze ist kompliziert und unterliegt einem ständigen Wandel durch neue wissenschaftliche Erkenntnisse. Auf dem Gebiet der medizinisch relevanten Pilze haben sich alternative Klassifikationen etabliert. Am verbreitetsten ist das DHS(B)-System, das die humanpathogenen Pilze in die Kategorien Dermatophyten, Hefen, Schimmelpilze und biphasische Pilze einteilt.

1.1.1 Pilze als humanpathogene Erreger

Beim Gesunden kommen Pilze als Kommensalen auf der (Schleim-) Haut vor und bilden vergleichbar zum Mikrobiom das „Mykobiom“ des Menschen (Gouba und Drancourt, 2015; RKI Kommission Umweltmedizin, 2004). Sie besiedeln dabei lediglich die Gewebeoberflächen und dringen nicht invasiv in das Gewebe ein.

Unter günstigen Bedingungen, z. B. Störung der physiologischen Bakterienflora durch Antibiotikatherapie, hormonellen Veränderungen, Störungen der Immunabwehr oder anderen Faktoren, können sie sich stark vermehren und zu endogenen Infektionen wie Vaginalmykosen oder Hautmykosen führen (Nationales Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen, 2020). Auch exogene Infektionen durch in der Umwelt vorkommende Pilze, z. B. *Aspergillus* spp., sind möglich (Lass-Flörl, 2009). Beim Immungesunden verlaufen diese Infektionen in der Regel lokal und sind mit Antimykotika gut therapierbar. Bei geschädigter Immunabwehr, zum Beispiel im Rahmen einer immunkompromittierenden Grunderkrankung (z. B. Diabetes mellitus, AIDS, Leukämien) oder einer iatrogenen Immunsuppression (z. B. Chemotherapie), können Pilzinfektionen hingegen schwerwiegend verlaufen und mit einer hohen Mortalität verbunden sein. Beispiele hierfür sind die invasive Aspergillose, invasive Candidiasis, *Pneumocystis-jirovecii*-Pneumonie und Kryptokokkose.

Einige wenige Pilze gelten als obligat pathogene Erreger, das heißt sie können auch bei Immungesunden schwere Infektionen hervorrufen. Beispiele hierfür sind Pilze wie *Coccidioides immitis* oder *Histoplasma capsulatum*. Diese dimorphen Pilze kommen in Europa jedoch nicht endemisch vor, Infektionen sind deshalb selten (Höck, 2016).

Allergische Reaktionen auf Pilzbestandteile (z. B. allergische Aspergillose) sowie Reaktionen auf die Aufnahme von Pilztoxinen (z. B. Aflatoxine, Amanitin) können sowohl bei immungesunden wie auch immunkompromittierten Patienten auftreten.

In der Augenheilkunde können Pilze prinzipiell als Erreger von Infektionen jedes Augenabschnittes vorkommen (z.B. Konjunktivitis, Keratitis, Uveitis, Endophthalmitis). Insgesamt spielen sie neben bakteriellen und viralen Erregern jedoch eine eher untergeordnete Rolle (Bograd et al., 2019). Begünstigt werden Pilzinfektionen des Auges durch Augentraumata, das Tragen von Kontaktlinsen, ophthalmologische Eingriffe und immunsupprimierende Erkrankungen (Durand, 2017; Kato et al., 2018; Qiao et al., 2020; Thomas und Kaliamurthy, 2013). Das Keimspektrum variiert, vor allem bei Keratitiden, abhängig von geographischen und klimatischen Bedingungen. Während in gemäßigten Klimazonen und industrialisierten Ländern *Candida*-Infektionen überwiegen, spielen in tropischen Gegenden Pilzkeratitiden mit filamentösen Pilzen (v. a. *Fusarium* spp. und *Aspergillus* spp.) eine größere Rolle (Mahmoudi et al., 2018; Thomas und Kaliamurthy, 2013). In Asien sind Pilzkeratitiden weit verbreitet und der häufigste Grund für Erblindung (Srinivasan, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich *Candida* spp. verwendet, weshalb diese Gattung im Folgenden genauer vorgestellt wird.

1.1.2 *Candida* spp.

Candidapilze gehören zur Gruppe der Sprosspilze bzw. Hefepilze. Sie liegen gewöhnlich als Einzelzellen vor und vermehren sich vor allem asexuell durch Sprossung (Schulze und Sonnenborn, 2009). Beim Menschen kommen sie als Kommensalen u. a. auf der Haut

bzw. im Darm vor. Als opportunistische Erreger können sie unter entsprechenden Bedingungen aber auch endogene Infektionen verursachen, z. B. Mundsoor, Soorösophagitis, Vaginitis und Balanitis, die zur invasiven und disseminierten Candidose mit Befall innerer Organe und Sepsis fortschreiten können. *Candida*-Pilze sind verantwortlich für den größten Teil der Pilzinfektionen beim Menschen (Haase, 2016c).

Insgesamt existieren über 150 *Candida*arten, von denen jedoch nur wenige in der Humanmedizin von Bedeutung sind. Dazu zählen u. a. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* sowie seit einigen Jahren *C. auris* (Borg-von Zepelin et al., 2007; Groll et al., 2020; Lortholary et al., 2014; Schulze und Sonnenborn, 2009). Im Folgenden werden die drei in dieser Arbeit verwendeten *Candida*arten vorgestellt.

Candida albicans

Candida albicans ist die bekannteste und mit Abstand am häufigsten aus klinischem Material isolierte *Candida*art (Borg-von Zepelin et al., 2007; Ruhnke, 2006). Es handelt sich um eine Hefe mit diploidem Chromosomensatz und polymorphem Wachstumsmuster. Sie ist in der Lage einen reversiblen Gestaltwechsel von rundlicher Hefezellform zu langgestreckter Hyphenform zu vollziehen (Nobile und Johnson, 2015; Silva et al., 2012). Dieser Mechanismus ist assoziiert mit dem Übergang von kommensalem zu invasivem Wachstum. Darüber hinaus existieren diverse andere Virulenzmechanismen, unter anderem die Fähigkeit zur Biofilmbildung (Hube, 2004; Nobile und Johnson, 2015). Wie bereits oben beschrieben, ist *Candida albicans* bei günstigen Bedingungen in der Lage lokale wie auch systemische Infektionen zu verursachen. Häufige Lokalisationen sind Vulvovaginitis, orale Candidiasis sowie Blutstrominfektionen (Pappas et al., 2018; Samaranayake et al., 2002).

Candida albicans ist auch eine der am häufigsten isolierte *Candida*-Art bei mykotischen Augeninfektionen (Kato et al., 2018; Qiao et al., 2020). Dabei treten sowohl exogene Infektionen, z. B. Keratitis nach Trauma oder iatrogener Genese, als auch seltener, endogene Infektionen, z. B. Endophthalmitis als Komplikation einer Candidämie (Durand, 2017; Kato et al., 2018; Sallam et al., 2006) auf.

Candida auris

Die Erstbeschreibung von *C. auris* erfolgte durch Satoh et al. (2009) in Japan. Sie isolierten die neue Spezies vom äußeren Ohr einer hospitalisierten Patientin. In den Folgejahren wurde *C. auris* unter anderem als Erreger von Otitis, Wundinfektionen und Blutstrominfektionen nachgewiesen sowie in Abstrichen von diversen Körperregionen festgestellt (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020; Lee et al., 2011; Schelenz et al., 2016; Tsay et al., 2017).

Candida auris erlangte in den letzten Jahren aufgrund seiner potenziell bedrohlichen Eigenschaften immer größere Aufmerksamkeit (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018; Kurzai et al., 2017): Problematisch sind oft hohe minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) für verschiedene häufig verwendete Antimykotika, vor allem Fluconazol, aber auch für andere Azole sowie Amphotericin B und seltener Echinocandine (Tsay et al., 2017). Auch Isolate mit hohen MHKs für mehrere Antimykotikaklassen kommen vor, was die Therapiemöglichkeiten stark einschränkt (Chowdhary et al., 2014; Khan et al., 2018). Weitere Probleme stellen die hohe Umweltresistenz sowie Schwierigkeiten bei der korrekten Identifizierung des Erregers durch automatisierte Laborgeräte dar (Cadnum et al., 2017; Welsh et al., 2017). Die oben genannten Faktoren begünstigen die Ausbreitung von *C. auris* und befähigen den Erreger zu nosokomialen Ausbrüchen (Schelenz et al., 2016).

Im Zusammenhang mit Entzündungen des Auges trat *C. auris* bisher erst in 2 Fallberichten auf: Shenoy et al. (2019) sowie Breazzano et al. (2020) beschrieben jüngst einen Fall von endogener Panophthalmitis bei einem immunkompromittierten Patienten unter Beteiligung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida auris* in den USA. Khan et al. (2018) fanden bei ihrer Studie in Kuwait einen Fall von Endophthalmitis durch *C. auris*.

Obwohl aufgrund der wenigen Fallberichte bisher nicht sicher geklärt werden kann, ob *Candida auris* alleine überhaupt Infektionen des Auges verursachen kann, wurde der Erreger in diese Arbeit aufgenommen. Gründe dafür waren die aktuell fortschreitende Relevanz, beschriebene Antimykotikaresistenzen, sowie die Fähigkeit zu invasiven Infektionen.

Candida glabrata

Nach *Candida albicans* ist *Candida glabrata* die in vielen Ländern am zweithäufigsten aus klinischen Proben isolierte Candidaart (Bolotin-Fukuhara und Fairhead, 2016; Borg-von Zepelin et al., 2007). Verschiedene Studien zeigen, dass die sogenannten „non-*albicans* *Candida spp.*“ in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung gewinnen (Tortorano et al., 2004). *Candida glabrata* als einer der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe ist u.a. verantwortlich für ca. 15% aller Candidämien (Lortholary et al., 2014; Tortorano et al., 2004; Wisplinghoff et al., 2014). Daneben ist *C. glabrata* fähig ein ähnliches Krankheitsspektrum zu verursachen wie *C. albicans* (Fidel et al., 1999; Kumar et al., 2019; Liu et al., 2014).

Im klinischen Kontext fällt *C. glabrata* vor allem durch seine intrinsisch herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Azolen auf (Wisplinghoff et al., 2014). In der Therapie kommen deshalb vermehrt Echinocandine zum Einsatz, wobei inzwischen zunehmend eine Selektion echinocandinresistenter Mutanten beobachtet wurde. (Alexander et al., 2013; Glöckner und Cornely, 2015; Pfaller et al., 2012)

In der Diagnostik ist das fakultativ anaerobe Wachstum zu beachten: Bei der Verwendung von Kulturautomaten wächst *C. glabrata* in aeroben Flaschen auffällig langsam, während in anaeroben Flaschen im Gegensatz zu anderen *Candida spp.* oft nach kürzerer Zeit Wachstum detektiert wird (Cobos-Trigueros et al., 2014; Fernandez et al., 2009). Dies ist auch für die mikrobiologische Testung von Korneatransplantaten relevant (vgl. 1.2.5).

1.2 Korneatransplantation

1.2.1 Anatomie und Funktion der Kornea

Die Kornea (synonym: Augenhornhaut) ist das Sichtfenster des Auges, ihre Transparenz ist essentiell für das Sehen. Außerdem leistet sie den Hauptanteil an der Gesamtbrechkraft des Auges.

Anatomisch betrachtet bildet die Kornea den vorderen Teil der äußeren Augenhaut und geht an ihrem Rand, dem Limbus, in die Sklera über. Das Korneagewebe ist zentral circa 0,52 mm dick und besteht aus 5 Schichten: Ganz außen, bedeckt vom Tränenfilm, liegt

ein mehrschichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel. Unter einer dünnen Basallamina folgt die kollagene Bowman-Membran. Darunter beginnt das Stroma, bestehend aus streng regelhaft in Schichten angeordneten Kollagenfibrillen und vereinzelt Fibroblasten. Zur Vorderkammer hin schließt sich die Descemet-Membran an, eine spezielle Basalmembran des darunter liegenden einschichtigen Korneaendothels (Drenckhahn und Rager, 2004; Lang, 2014; Sekundo, 2007).

Die Transparenz der Kornea entsteht einerseits durch die regelmäßige Anordnung der Kollagenfibrillen im Stroma und andererseits durch den konstanten Wassergehalt von 72-82% (Drenckhahn und Rager, 2004). Dieser wird vom Endothel aufrechterhalten, welches ständig Wasser aus der Hornhaut herauspumpt. Bei zu niedriger Endothelzellichte trübt die Kornea wegen nicht ausreichender Pumpfunktion ein. Das Endothel ist nicht regenerationsfähig.

Die gesamte Kornea ist beim gesunden Auge nicht vaskularisiert. Die Ernährung erfolgt aus den umgebenden Gefäßen, dem Kammerwasser und dem Tränenfilm. Die sensible Innervation wird durch den Nervus ophthalmicus aus dem ersten Trigeminusast gewährleistet. Das Korneaepithel schützt vor Eindringen von Keimen und regeneriert bei Bedarf sehr schnell aus Limbuszellen am Rand der Kornea. Zusätzlichen Schutz bieten der Spüleffekt der Tränenflüssigkeit sowie das in der Tränenflüssigkeit enthaltene antimikrobiell wirkende Lysozym (Lang, 2014).

1.2.2 Indikationen und Varianten der Keratoplastik

Die Keratoplastik kommt bei Erkrankungen zum Einsatz, bei denen die Kornea in ihrer Funktion stark eingeschränkt ist und so keine ausreichende Sehkraft mehr ermöglicht. Je nach Grunderkrankung werden meist zunächst die konservativen Therapieoptionen ausgeschöpft, bevor es zur Keratoplastik kommt. Häufige Indikationen sind Hornhautdystrophien, insbesondere die Fuchs'sche Endotheldystrophie, Keratokonus, Re-Transplantation bei Transplantatversagen sowie Hornhautnarben nach Infektionen oder Traumata.

Je nach Indikation und abhängig davon, welche Schichten der Kornea durch die Erkrankung geschädigt sind, kommen verschiedene Operationstechniken in Betracht. Die älteste

Methode ist die perforierende Keratoplastik, bei der die komplette Hornhaut mit allen 5 Schichten ersetzt wird. Inzwischen ist es aber auch möglich, nur die erkrankte Schicht zu ersetzen. Man unterscheidet dabei die hinteren lamellären Verfahren, auch endotheliale Keratoplastiken genannt (Descemet Stripping Automated Endothelial Keraoplasty (DSAEK) und Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK)), von den vorderen lamellären Verfahren (Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK)) (Cursiefen und Heindl, 2011; Cursiefen und Kruse, 2009, 2010; Maier et al., 2013). Auf Details wird hier verzichtet, da sie nicht wesentlich für diese Arbeit sind. Es soll lediglich erwähnt werden, dass lamelläre Verfahren zwar verschiedene Vorteile für den Patienten bieten, der Trend hin zu diesen Operationsverfahren aber auch als mögliche Ursache für den Anstieg der Zahl an postoperativen Pilzinfektionen diskutiert wird (Brothers et al., 2017; Edelstein et al., 2016; Flockerzi et al., 2018).

1.2.3 Gewinnung und Lagerung von Spenderhornhäuten

Bei Korneaspenden handelt es sich um postmortale Gewebespenden. Bei der Gewinnung von Spendergewebe sowie bei Transport, Verarbeitung und Lagerung des Gewebes sind die im jeweiligen Land geltenden gesetzlichen Vorgaben einzuhalten.

In Deutschland wird die Korneaspende und der Umgang mit Spenderhornhäuten durch das Transplantationsgesetz, die Transplantationsgesetz-Gewebeverordnung, das Arzneimittelgesetz und die Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung geregelt. Darin finden sich unter anderem Vorgaben zu Einwilligung, Feststellung des Todes sowie Ausschlusskriterien für eine Hornhautspende. Auch das Vorgehen bei der Gewebeentnahme sowie der Transport und die Verarbeitung der Hornhaut in einer dazu berechtigten Hornhautbank unterliegen den oben genannten Gesetzen. Zusätzlich existiert in Deutschland eine von der Bundesärztekammer und dem Paul-Ehrlich-Institut als zuständige Bundesbehörde verfasste „Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank“ (Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 2018), die die Gesetze um aktuell anerkannte wissenschaftliche Erkenntnisse ergänzt.

Im Folgenden wird kurz auf die für diese Arbeit relevanten Aspekte bei Entnahme und Lagerung von Spenderhornhäuten eingegangen. Sofern nicht anders angegeben beziehen sich die Schilderungen auf die Vorgehensweise in Deutschland.

Entnahme der Spenderhornhaut

Die Entnahme der Spenderhornhaut erfolgt unter sterilen Bedingungen. Eine Verunreinigung des Spendergewebes ist unter allen Umständen zu vermeiden, da das Gewebe nicht sterilisiert werden kann und postoperative Infektionen beim Empfänger eine schwerwiegende Komplikation darstellen. Das Auge, insbesondere die Hornhaut und die umgebende Bindehaut, werden deshalb zunächst gereinigt. In der Regel kommen dabei PVP-Jod (1-10 %), andere geeignete Desinfektionsmittel, Natriumchloridlösung, Antibiotika oder eine Kombination dieser Substanzen zum Einsatz (European Eye Bank Association, 2018). Anschließend wird der Arbeitsbereich steril abgedeckt. Die eigentliche Entnahme kann dann entweder als vollständige Bulbusentnahme oder als Corneoskleralkomplexentnahme erfolgen (Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 2018; European Eye Bank Association, 2019; Fontana et al., 2007).

Lagerung der Spenderhornhaut

Zur Lagerung der entnommene Korneae bis zur Transplantation gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten (Armitage, 2011; Pels et al., 2008; Pels und Rijneveld, 2009):

Bei der hypothermen Lagerung (auch Kurzzeitkultur oder „cold storage“ genannt) wird die Kornea bei einer Temperatur zwischen +2° C und +8° C gelagert. Die maximale Lagerzeit darf dabei 14 Tage nicht überschreiten. Die Organkultur bei +30° C bis +38° C erlaubt eine längere Lagerzeit von bis zu 34 Tagen. Dabei ist in Deutschland ein Medienwechsel vorgeschrieben (Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 2018). An die eigentliche Organkultur schließt sich meist eine Entschwellung in dextranshaltigem Medium an (Pels und Rijneveld, 2009). In Europa wird fast ausschließlich die Organkultur eingesetzt, genauso wie in Australien und Neuseeland. Insgesamt überwiegt dennoch die hypotherme Lagerung, die vorrangig in den USA praktiziert wird (Gain et al., 2016).

Das Kulturmedium ähnelt Zellkulturmedien und besteht in der Regel aus MEM mit diversen Zusätzen. In Deutschland stellen viele Hornhautbanken ihr Kulturmedium selbst her, einige verwenden käuflich erwerbbar Medien. Zu den möglichen Zusätzen zählen unter anderem fetales Kälberserum (FCS) und verschiedene Puffersubstanzen (European Eye Bank Association, 2018). Außerdem werden dem Medium verschiedene antimikrobielle Substanzen zugesetzt. Sowohl bei der hypothermen Lagerung als auch bei der Organkultur kommen Antibiotika zum Einsatz. In Europa verwenden fast alle Hornhautbanken eine Kombination aus Penicillin und Streptomycin. Eine einheitliche Konzentration ist nicht vorgeschrieben und variiert daher stark zwischen den Hornhautbanken. In den USA ist das kommerziell erwerbliche Medium „Optisol-GS“ das am meisten verbreitete Kornealagerungsmedium. Es enthält Gentamicin an Stelle von Penicillin.

In Europa ist zusätzlich die Zugabe eines Antimykotikums zur Eliminierung potenziell am Gewebe vorhandener Pilze üblich. Dabei wird fast ausschließlich Amphotericin B verwendet, nur einzelne Hornhautbanken setzen stattdessen Nystatin ein (European Eye Bank Association, 2018). Sowohl Amphotericin B als auch Nystatin sind Wirkstoffe aus der Gruppe der Polyene. Amphotericin B ist eines der ältesten Antimykotika und weist ein sehr breites Wirkspektrum und eine hohe Wirksamkeit auf, Resistenzen sind selten (Ellis, 2002; Enoch et al., 2006; Lass-Flörl et al., 2008; Montagna et al., 2014). Die Wirkweise besteht in der Interaktion mit Ergosterol in der Pilzzellmembran. Es kommt zur Porenbildung und damit zu einer erhöhten Permeabilität der Membran für Ionen und niedermolekulare Substanzen (Ellis, 2002; Rodrigues et al., 2014). Darüber hinaus scheint es noch weitere noch nicht genau bekannte Mechanismen zu geben, die die fungizide Wirkung beeinflussen (Brajtburg et al., 1990). Seit der Entwicklung anderer Antimykotikagruppen wird Amphotericin B am Patienten zurückhaltender verwendet, da es ein großes Nebenwirkungsspektrum, insbesondere eine hohe Nephrotoxizität, besitzt (Lanternier und Lortholary, 2008; Pappas et al., 2016). In Zellkulturen ist Amphotericin B hingegen weiterhin ein verbreitetes Mittel, um vor Pilzkontaminationen zu schützen. Zu beachten ist seine begrenzte Stabilität in Lösung abhängig von der Temperatur sowie die Photosensibilität.

Die in den USA verbreiteten Medien zur hypothermen Kornealagerung enthalten kein Antimykotikum. Die Zugabe eines Antimykotikums wird von der Eye Bank Association of America (EBAA) nicht empfohlen. Das zuständige Subkomitee bewertet die Studienlage

als nicht ausreichend, um zu einer abschließenden Risiko-Nutzen-Abwägung zu kommen. Offene Fragen bestehen hinsichtlich Effektivität, Resistenzen und Resistenzbildung, Beeinflussung der Gewebequalität und der mikrobiologischen Testung (Aldave et al., 2013).

1.2.4 Infektionen nach Keratoplastik

Infektionen stellen eine seltene, aber sehr schwerwiegende Komplikation nach einer Korneatransplantation dar. Prinzipiell kommen verschiedene Infektionsquellen in Frage: Die Erreger können vom Spender stammen oder während der Verarbeitung und Lagerung in der Hornhautbank auf das Gewebe gelangen. Auch eine Kontamination während der Operation oder eine Infektion erst nach der Operation sind denkbar.

Verschiedene Fallberichte und Studien belegen, dass die Übertragung von Spender zu Empfänger eine vorrangige Rolle spielt. Mikrobiologische Kulturen der nicht transplantierten Ränder von Spenderkorneae zeigten, dass zumindest bei mykotischen Infektionen oftmals die gleichen Erreger im Empfänger und auf den Transplantatresten nachzuweisen sind (Kiatos et al., 2017; Merchant et al., 2001; Sutphin et al., 2002). Ein positives Kulturergebnis erhöht die Wahrscheinlichkeit einer postoperativen Endophthalmitis um das 12-fache (Wilhelmus und Hassan, 2007). Aldave et al. (2013) zeigten in ihrer Studie, dass die beiden Korneae eines Spenders häufig mit den gleichen Mikroorganismen belastet sind. Führt eine der beiden Korneae zu einer postoperativen Infektion im Empfänger, so liegt die Wahrscheinlichkeit, dass die andere Kornea ebenfalls zu einer Infektion führt bei zwei Drittel. Diese Erkenntnisse sprechen für eine Übertragung von Infektionserregern von Spender zu Empfänger.

1.2.4.1 Bakterielle Kontaminanten

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Infektionen durch Pilzkontaminanten, dennoch spielen auch bakterielle Erreger eine wichtige Rolle.

Ältere Studien aus den USA belegen, dass bakterielle Infektionen früher den größten Teil der Infektionen nach Keratoplastik ausmachten (Hassan und Wilhelmus, 2005). In den 1990er Jahren wurde dort durch die Einführung des kommerziellen Mediums „Optisol-GS“ (enthält Gentamicin und Streptomycin) ein deutlicher Rückgang bakterieller Infektionen beobachtet (Hassan und Wilhelmus, 2005). Diese Daten sind jedoch nicht auf Europa übertragbar, da hier andere Medien und vor allem Organkultur verwendet werden.

Das Erregerspektrum bei bakteriellen post-Keratoplastik-Infektionen umfasst insbesondere Bakterien aus den Gruppen der Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken sowie *Pseudomonas aeruginosa* (Albon et al., 2001; Davila und Mian, 2016; Edelstein et al., 2016; Linke et al., 2013; Zanetti et al., 2005). Auch (multi-) resistente Bakterien kommen als Erreger bei post-Keratoplastik-Infektionen vor (Hernandez-Camarena et al., 2012; Serna-Ojeda et al., 2018). Eine Studie aus Spanien legt zudem nahe, dass die bisher verwendeten Antibiotika wegen der sich wandelnden Resistenzlage eventuell nicht mehr ausreichen (Villalba et al., 2020).

1.2.4.2 Pilzkontaminationen als zunehmende Gefahr

In den vergangenen Jahren wurde ein Anstieg von Pilzinfektionen nach Keratoplastik festgestellt. Dabei ist nicht nur die Inzidenz gestiegen, es zeigte sich auch eine Umkehr des Verhältnisses von bakteriellen zu fungalen Infektionen: Während im Beobachtungszeitraum 1991 bis 2003 in 26% aller kulturpositiven Proben von Patienten mit post-Keratoplastik-Endophthalmitis Pilze nachgewiesen wurden, betrug dieser Anteil im Zeitraum 2007 bis 2010 63% bzw. 2007 bis 2014 65% (Aldave et al., 2013; Edelstein et al., 2016; Hassan und Wilhelmus, 2005). Die Inzidenz von Pilzkeratitis und Pilzendophthalmitis nach Keratoplastik stieg von 0,014% (2007-2010) auf 0,023% (2007-2014), mit einem deutlichen Aufwärtstrend in den Jahren 2012-2014 (Aldave et al., 2013; Edelstein et al., 2016). Bei den genannten Studien handelt es sich um groß angelegte Auswertungen von Daten der Eye Bank Association of America. Andere kleinere Studien ermittelten schwankende Inzidenzwerte von 0,033%-0,066% (2006-2011) bzw. 0,099% (1987-1990) für fungale Post-Keratoplastik-Endophthalmitis bzw. 0,16% (1998-2002) für alle Arten von fungalen

Post-Keratoplastik-Infektionen (Du et al., 2014; Keyhani et al., 2005; Kloess et al., 1993). Wegen der insgesamt sehr niedrigen Anzahl an Fällen sind alle diese Zahlen vorsichtig zu behandeln. Zu beachten ist außerdem, dass alle genannten Studien aus Amerika stammen und die Zahlen nur die dortige Situation abbilden können.

Als Erreger werden übereinstimmend vor allem *Candida spp.* genannt, am häufigsten *C. albicans* (Aldave et al., 2013; Edelstein et al., 2016; Keyhani et al., 2005; Lau et al., 2019; Vislisel et al., 2017). Aber auch *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* und andere konnten identifiziert werden (Chen et al., 2015; Davila und Mian, 2016; Merchant et al., 2001; Tsui et al., 2016).

In der Literatur finden sich verschiedene Ansichten zu Gründen für den Anstieg an Pilzinfektionen nach Keratoplastik: Manche Autoren sehen den Grund vor allem im Trend hin zu lamellären Verfahren, welche zum Teil aufwändigere Präparationen des Spendergewebes mit längeren oder wiederholten Aufwärmphasen erfordern (Aldave et al., 2013; Brothers et al., 2017; Edelstein et al., 2016). Erreger können sich nach solchen Operationen zudem unbemerkter vermehren, da sie sich im künstlich geschaffenen Raum zwischen Transplantat und Empfänger-Restkornea befinden können (Fontana et al., 2019). Andere Autoren vermuten den Zusatz von Antibiotika zum Lagermedium, welche das Wachstum von Bakterien unterdrücken, als Ursache. Edelstein et al. (2016) beschreiben dies als Generieren einer „nicht-kompetitiven Wachstums Umgebung“ für mögliche Pilzkontaminanten. Wieder andere diskutieren die Assoziation von Pilzinfektionen mit dem Fehlen von Antimykotika in hypothermen Lagermedien. Lau et al. (2019) zeigten in einer Studie mit über 16000 Spenderhornhäuten aus 16 europäischen Hornhautbanken, dass Pilzinfektionen nach lamellärer Keratoplastik häufiger bei Transplantaten aus hypothermer Lagerung auftreten. Als Grund vermuten sie neben der Rolle der Antimykotika, dass Organkultur mikrobiologische Untersuchungen der Spenderhornhäute und damit die Detektion von Kontaminationen erleichtert. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Studie von Fontana et al. (2007), die zeigte, dass positive Kulturen von Geweberändern transplantierte Spenderhornhäute häufiger mit hypothermer Lagerung als mit Organkultur assoziiert sind. Grund dafür ist unter anderem,

dass während der Organkultur bereits Kontaminationen auffallen und die entsprechenden Hornhäute gar nicht erst zur Transplantation freigegeben werden.

Die Uneinigkeit über die Gründe für den Anstieg von Post-Keratoplastik-Pilzinfektionen setzt sich auch bei der Frage der Lösungsstrategien fort. Eine generelle Überlegenheit der Organkultur wird genauso diskutiert wie die Sinnhaftigkeit der Kultur von Geweberändern von Spenderhornhäuten nach der Transplantation. Als zentraler Aspekt hat sich in den letzten Jahren vor allem die Frage nach der Effektivität antimykotischer Zusätze in (hypothermen) Lagerungsmedien herausgestellt, mit der sich diese Arbeit befasst.

1.2.5 Mikrobiologische Testung von Korneatransplantaten

In Anbetracht des Infektionsrisikos durch kontaminierte Spenderhornhäute kommt der mikrobiologischen Testung eine besondere Bedeutung zu. Die Sensitivität der Testung hängt von den Lagerbedingungen sowie der Art der Testung ab. In Ländern ohne präzise gesetzliche Regulierung erfolgt die Bewertung zum Teil lediglich durch visuelle Begutachtung des Mediums (Trübung, Farbumschlag des pH-Indikators) (Chu et al., 2000; Merchant et al., 2001; Thuret et al., 2002; Thuret et al., 2005).

In Deutschland ist eine Sterilitätstestung des Lagermediums an Tag 5 ± 2 nach Beginn der Lagerungszeit vorgeschrieben (Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 2018). In vielen Hornhautbanken erfolgt dies mithilfe von Kulturautomatensystemen, welche verhältnismäßig zuverlässig Kontaminationen detektieren können und gleichzeitig wenig arbeitsintensiv sind (Thuret et al., 2002). Kulturelle Methoden sind zwar schon lange etabliert, weisen jedoch auch Nachteile auf: So dauert die Testung in Kulturautomaten meist zwischen 7 und 14 Tagen bis ein abschließendes Ergebnis vorliegt. Außerdem stellt sich die Frage, inwiefern antimikrobielle Zusätze im Lagermedium und die Lagertemperatur die Detektion von Kontaminanten mittels kultureller Testmethoden beeinflussen.

Mikrobiologische Methoden, die auf dem Nachweis von DNA der Mikroorganismen beruhen, weisen oft eine höhere Sensitivität auf, werden weniger von antimikrobiellen Substanzen beeinträchtigt und liefern schneller Ergebnisse. Sie finden bei der Testung von Spenderhornhäuten aber noch keine breite Anwendung (Hariya et al., 2017).

Erschwert wird die mikrobiologische Bewertung insgesamt auch durch die Tatsache, dass es sich bei Hornhäuten nicht prinzipiell um steriles Gewebe handelt. Auch auf gesunden Augen sind Mikroorganismen nachweisbar, die nicht zwingend als Infektionserreger zu werten sind (Segal et al., 1977). Eine Sterilisation von lebendem Gewebe ist nicht möglich, es kann lediglich versucht werden durch optimale Entnahme- und Dekontaminationstechniken und den Einsatz von Antibiotika und Antimykotika die Keimbelastung zu reduzieren.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Effektivität des Antimykotikums Amphotericin B hinsichtlich der Reduktion möglicher Kontaminanten von Korneatransplantaten zu untersuchen. Dabei soll die Wirkung abhängig von Lagertemperatur, Lagerzeit und Konzentration des Antimykotikums untersucht werden. Des Weiteren soll die Zuverlässigkeit der Detektion von Kontaminanten durch konventionelle mikrobiologische Testsysteme überprüft werden und eine Aussage darüber getroffen werden, ob der Zusatz von Amphotericin B zum Kulturmedium die Detektion beeinträchtigt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob molekularbiologische Methoden eine Alternative zu kulturbasierten Testmethoden bei der Testung von Korneatransplantaten darstellen. Dazu sollen PCR und zukunftsweisende Methoden wie das Next Generation Sequencing auf ihre praktische Anwendbarkeit überprüft werden.

Neben dem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn soll diese Arbeit auch einen Beitrag dazu leisten, die wissenschaftliche Grundlage für regulatorische Bestimmungen bezüglich der mikrobiologischen Sicherheit von Korneatransplantaten zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Nährmedien, Medienzusätze, Puffer und Chemikalien

Tab. 1: Nährmedien

Materialart	Bezeichnung	Hersteller, Standort, Land
Chromagar Candida	Brilliance™ Candida Agar (Oxoid™)	Thermo Fisher Diagnostics GmbH Microbiology, Wesel, Deutschland
Kulturautomatflaschen, anaerob	BACT/ALERT iFN Plus	Biomérieux Inc., Durham, NC, USA
Kulturautomatflaschen, aerob	BACT/ALERT iFA Plus	
RPMI Agarplatten	RPMI Agarplatten	Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich
RPMI Pulver	RPMI-1640 Medium, Powder (R6504)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sabouraud Flüssigmedium 2 % Glucose		Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Sabouraud Agar 4 % Glucose		

Tab. 2: Puffer, Medienzusätze, Chemikalien

Materialart	Bezeichnung	Hersteller, Standort, Land
Amphotericin B	Amphotericin B, 250 µg/ml, liquid, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Betamercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid	
Glucose	D-Glucose, anhydrous, Fluka®	
HEPES Puffer	HEPES solution, 1 M	
Minimal Essential Medium	MEM Eagle mit EBSS und L-Glutamin	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
MOPS	MOPS ≥99.5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaCl 0,85 %		Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
NaOH	Natronlauge	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Penicillin-Streptomycin Solution (10,000 U/mL), Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Reinstwasser		Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
TAE-Puffer		

2.1.2 Antimykotika für MHK-Bestimmungen

Tab. 3: Antimykotika

Materialart	Bezeichnung	Hersteller, Standort, Land
Amphotericin B Pulver	Amphotericin B, Powder, Ph. Eur. Reference Standard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fluconazol Pulver	Fluconazol ≥ 98 %, Powder	
E-Test Amphotericin B	E-TEST [®] Amphotericin B, Blister	Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich
E-Test Fluconazol	E-TEST [®] Fluconazol, Einzelverpackung	

2.1.3 Molekularbiologische Enzyme, Reagenzien und gebrauchsfertige Kits

Tab. 4: Materialien zur DNA-Isolation

Materialart	Bezeichnung	Hersteller, Standort, Land
DNA-Isolations-Kit	Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Germany
Enzym „Zymolyase“	R-Zymolyase (with RNase A)	
Puffer	YD Digestion Buffer	

Tab. 5: Materialien für PCR, qPCR und Gelelektrophorese

Materialart	Bezeichnung	Hersteller, Standort, Land
Agarose	Agarose Standard	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Auftragsfarbstoff	6x Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNA Größenmarker	GeneRuler™ 100 bp Plus DNA-Leiter	
dNTPs	dNTP Mix, PCR Grade, 10 mM	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTPs	dNTPs 10 mM	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Ethidiumbromidlösung 0,5 % (5 mg/ml), Tropfflasche	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Master Mix „Long Amp“	Long Amp MM 2x	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated), Invitrogen™, Ambion™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

PCR Puffer für „Taq“	Taq DNA Polymerase 10x PCR Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PCR Puffer für „Ventexo“	ThermoPol® Reaction Buffer, 10x	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Taq Polymerase	Taq DNA Polymerase 5 U/µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Vent® (exo-) Polymerase	Vent® (exo-) DNA Polymerase 2 U/µl	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Quantifluor-Reagenz zur DNA-Quantifizierung	QuantiFluor® ONE dsDNA dye	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
SYBR Green Master Mix	LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
TapeStation Screentape (Chip) und Reagenzien	D1000 Screentape + Reagents (Sample Buffer + Ladder)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA

Tab. 6: Materialien zur Sequenzierung

Materialart	Bezeichnung	Hersteller, Standort, Land
Sequencing Library Preparation Kit	Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109)	Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK
T4 Ligase	NEBNext Quick T4 Ligase	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Flowcell-Beladungsreagenzien	Flow Cell Priming Kit	Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK
Paramagnetische SPRI Beads	Agencourt AMPure XP beads	Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA

Tab. 7: Primer ITS-Region

Primernamen	Sequenz	Quelle
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Tab. 8: *Candida* spezifische Primer (aus Palka-Santini et al., 2009)

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Amplikonlänge
<i>BGL2</i>	GATTAATGACATCAAGGGTTT	GCAAAGCTTGCATAACATC	230 bp
<i>GNA1</i>	CACAAGGTTATACATTCAGAA	CTACATACCATTTC AACACCAC	433 bp
<i>MNT1</i>	GCTCGTTTGATTAGATTTGG	TGTT CACGGACTAAAGCAG	563 bp
<i>RBT4</i>	GTGGTGT TACTGTTGGTGAA	GTAGCATCCCAAGTACCCTC	625 bp
<i>RIM8</i>	ATAACCCACATAAGGTCTGG	AGCTAGTTCGTGGATCTTTG	543 bp

Alle Primer wurden lyophilisiert bezogen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland und gelagert als „stock solution“ (100 µM) bzw. Arbeitslösung (10 µM) bei -20 °C.

2.1.4 Pilzstämme

Tab. 9: Verwendete Pilzstämme, genaue Kennzeichnung und Bezugsorganisation

Pilzspezies	Stamm	Bezugsorganisation
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	American Type Culture Collection, Germany Office, Wesel, Deutschland
<i>Candida auris</i>	DSMZ 21092	Leibniz-Institut - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
<i>Candida auris</i>	CDC AR#0389	Nationales Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen, Würzburg/Jena, Deutschland
<i>Candida auris</i>	CDC AR#0390	
<i>Candida glabrata</i>	CDC AR#0318	
<i>Candida glabrata</i>	CDC AR#0320	

2.1.5 Klinisches Probenmaterial

Die Hornhautbank der Charité – Universitätsklinik Berlin stellte 16 verschiedene klinische Proben für Versuchszwecke zur Verfügung. Dabei handelte es sich um menschliche Korneae in ihrem Lagermedium bzw. um Proben des Lagermediums. Bei allen Proben lagen nachgewiesene Kontaminationen vor, sodass die Korneae durch die Hornhautbank

verworfen wurden. Das klinische Probenmaterial erreichte uns ohne klinische Daten zu den Spendern. Bis zur Versuchsdurchführung wurde es bei 4 °C gelagert.

Ein Ethikvotum basierend auf der Deklaration von Helsinki war für die durchgeführten Versuche nicht erforderlich, da keine Experimente an menschlichem Gewebe selbst durchgeführt wurden, sondern lediglich das Lagermedium untersucht wurde. Weil keine personenbezogenen Daten vorlagen, handelte es sich demnach um nicht-identifizierbare menschliche Materialien (WMA-Generalversammlung, 1964). Dazu sei auch auf die Entscheidung der Ethikkommission an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in einer vergleichbaren Fragestellung (Geschäftsnummer 154/15) verwiesen.

2.1.6 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Tab. 10: Verbrauchsmaterialien

Materialart	Bezeichnung	Hersteller, Standort, Land
Flowcell für MinION-Sequenziergerät	Flongle-Flowcell	Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK
Impfösen	1 µl Impfösen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Injektionskanülen	BD Eclipse™ Needle, versch. Maße	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Küvetten	Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Laborglasflaschen	SCHOTT DURAN® Laborglasflaschen 500 ml und 1000 ml	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/ Main, Deutschland
Reaktionsgefäße	Reagiergefäß SafeSeal (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
	Reagiergefäß 1,5 ml DNA Low Bind	
	PCR-Ketten 0,2 ml	
Pasteurpipetten	Pasteur pipette 7 ml	VWR International GmbH, Leuven, Belgien
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tip 1250 µl/ 300 µl/ 100 µl/ 20 µl	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (für Plattiergerät)	Gamma-Irradiated Microsyringes	IUL S.A., Barcelona, Spanien
Probenbecher (für Plattiergerät)	Gamma-Irradiated Sample Beakers	

Röhrchen	Röhre 5 ml 75x12 mm PS	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Pipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
	Serological Pipettes 50 ml	VWR International GmbH, Leuven, Belgien
Spatel	Spatel L-form steril	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Spritzen	Omnifix Luer solo 1 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter (Flaschenaufsatz)	Nalgene 500 ml Rapid-Flow Bottle top Filter, 0,2 µm SFCA membrane	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Verbrauchsmaterial TapeStation	Optical tube strips + caps	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
	Loading tips	
Wattetupfer	Sterile Applikatoren	Paul Boettger GmbH & Co. KG, Bodenmais, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Cellstar Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-well-Platten Light Cycler	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
96-well- Abdeckfolien Light Cycler	LightCycler® 480 Sealing Foil	
96-well-Platten	Nunc 96-Well Flat Bottom, Nunclon Selta Surface	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark

Tab 11.: Laborgeräte

Art des Gerätes	Modell	Hersteller, Standort, Land
Ausplattiergerät „Spiral Plater“	Eddy Jet 2 Spiral Plater	IUL Barcelona, Spanien
Brenner	Fuego SCS Basic	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Elektrophorese-System, automatisiert	TapeStation 4150	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
E-Test und Mikrodilutions Lese- und Auswertegerät	BIOMIC V3	Giles Scientific Inc. Santa Barbara, California, USA
Fluorometer	Quantus™ Fluorometer	Promega Corporation, Fitchburg, USA
Gelelektrophorese-kammer und Netzteil	Bio-Rad PowerPac™	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Gel-Imaging-System	ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA

Heizblock	Thermomixer 3436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Thermomixer compact	
Bead-Beater	FastPrep-24™ 5G	MP Biomedicals, Irvine, Kalifornien, USA
Hulamixer (Rotator)	Rotator verstellbar 90° bis 27°	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Inkubator	Heratherm Incubator	Thermo scientific, Massachusetts, USA
	Heraeus Inkubator BK 6160	Thermo electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
	BINDER Kühlinkubator KB 53 (E3.1)	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kolonienzähler, automatisiert	SphereFlash® – Automatic Colony Counter	IUL Barcelona, Spanien
Kolonienzähler, manuell	Colony counter SC5	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Kulturautomat	BACT/ALERT 3D, BTA 3D Incubator	Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich
McFarland Messgerät	DensiCHEK Plus	
pH-Messgerät	inoLab® pH 7310	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Pipette	Eppendorf Research Plus, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Switzerland
Schüttler	Certomat R und Certomat H	B. Braun Biotech International GmbH/ seit 2000 Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	New Brunswick™ Innova® 44	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sequenziergerät	MinION (mit Flongle-Adapter)	Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK
Sicherheitswerkbank	SterilGard Hood Class II Type A/B3	The Baker Company, Sanford, Maine, USA
	Safe 2020	Thermo Scientific electron LED GmbH, Langenselbold
Spektralphotometer	NanoDrop One ^C	Thermo fisher scientific, Massachusetts, USA
Thermocycler (PCR)	Applied Biosystems™ ProFlex PCR-System	
Thermocycler (qPCR)	LightCycler® 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Tischzentrifuge, klein	Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5415R	

Tischzentrifuge, groß	Thermo Scientific SL 16R	Thermo electron LED GmbH, Osterode, Deutschland
	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo scientific, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge, mini	Color Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hesisch Oldendorf, Deutschland
Vortexer	Vibrofix VF1	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Waage	Laborwaage	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Zelldichte-Messgerät	Ultrospec™ 10	Biochrom Ltd., Cambridge, UK

2.1.7 Computerprogramme

Tab. 12: Verwendete Software

Software name	Hersteller, Standort, Land
GraphPad Prism 8 und 9	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Image Lab	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
LightCycler 480 Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Vector NTI Advance	Invitrogen/ Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

2.2 Methoden

Alle Arbeitsschritte wurden in angemessener Umgebung, d.h. wenn nötig unter einer Sterilbank, durchgeführt. Die molekularbiologischen Versuche erfolgten in dafür geeigneten abgetrennten Räumlichkeiten, um (Kreuz-)Kontaminationen zu vermeiden.

2.2.1 Kultivierung der untersuchten Pilzstämmen

Alle verwendeten *Candida spp.* wurden standardmäßig auf Sabouraud-Agar 4 % Glucose für 24-48 h bzw. in Sabouraud-Flüssigmedium 2 % Glucose über Nacht jeweils bei 37 °C kultiviert. Für spezielle Anwendungen (u.a. Mikrodilution, E-Test, Speziesdifferenzierung) wurden methodenspezifische Nährmedien und Inkubationszeiten verwendet (s.u.).

2.2.2 Keimzahlbestimmung

Die Keimzahlbestimmung von Inokulumsuspensionen und von Pilzzellen in Kornea-lagerungsmedium (siehe 2.2.6) erfolgte durch Ausplattieren auf Sabaroud-Agarplatten. Dazu wurde zunächst eine 1:10 Verdünnungsreihe der entsprechenden Suspension in 0,85 %iger Natriumchlorid-Lösung hergestellt. Die Anzahl der Verdünnungsstufen wurde unter Berücksichtigung der zu erwartenden Keimzahl gewählt. Anschließend wurden 100 µl jeder Verdünnungsstufe auf Agarplatten ausplattiert. Das Ausplattieren erfolgte stets in Triplikaten (3 Agarplatten pro Verdünnungsstufe), entweder von Hand mit einem Drigalskispatel oder unter Zuhilfenahme des Spiral-Plater-Gerätes.

Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien entweder mithilfe des manuellen Kolonienzählers oder automatisiert mit dem SphereFlash®-Gerät gezählt. Es wurden nur die Verdünnungsstufen berücksichtigt, bei denen mindestens 7 Kolonien pro Platte gewachsen sind und ein Abgrenzen einzelner Kolonien nicht durch zu dichtes Wachstum behindert wurde. Aus der mittleren Anzahl der Kolonien pro Platte wurde dann auf die Keimzahl in KBE/ml zurückgerechnet.

2.2.3 Sterilitätstestung im Kulturautomaten

Zur Sterilitätstestung der verwendeten Medien und zur Nachbildung der mikrobiologischen Testung von Kornea-Aufbewahrungslösungen in Hornhautbanken wurde das Kulturautomatensystem BACT/ALERT® verwendet. Das System detektiert Wachstum von Mikroorganismen in beimpften Kulturflaschen durch den Farbumschlag eines Sensors am Boden jeder Flasche. Der Farbumschlag wird durch die Änderung des pH-Wertes infolge der CO₂-Produktion durch wachsende Mikroorganismen ausgelöst.

Pro Probe wurde je ein Paar Kulturautomatenflaschen, bestehend aus einer Flasche mit aeroben und einer mit anaeroben Wachstumsbedingungen, beimpft. Dazu wurden zunächst die Schutzkappen entfernt und der obere Teil der Flaschen desinfiziert. Anschließend wurden mithilfe steriler Spritzen und Injektionsnadeln 10 ml Probe in jede Flasche injiziert. Die Flaschen wurden dann unverzüglich im Kulturautomaten platziert und bei 32,5 °C (anaerobe Flaschen) bzw. 22,5 °C (aerobe Flaschen) für 7 Tage inkubiert. Bei

positivem Ergebnis wurde die Inkubation umgehend beendet. Die Wahl von Inkubationstemperatur und -dauer erfolgte anhand der Angaben zur Sterilitätstestung im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur., Kapitel 2.6.27) sowie der Herstellerangaben des Kulturautomaten.

2.2.4 Methoden der Resistenzbestimmung

Mit jedem verwendeten *Candida*-Stamm wurde mindestens ein Verfahren durchgeführt, welches das Resistenzverhalten untersucht:

Mikrodilution

Die Mikrodilution ist die vom „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ (EUCAST) empfohlene Referenzmethode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums oder Antimykotikums für einen spezifischen Erreger. Die minimale Hemmkonzentration ist definiert als die niedrigste Konzentration der zu testenden Substanz, die das Wachstum des Pilzes inhibiert (EUCAST, 2020a). Bei der Mikrodilutionsmethode wird die MHK bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe der entsprechenden Substanz in Nährmedium hergestellt wird, die dann mit einer Pilzsuspension versetzt wird. Nach einer festgelegten Inkubationszeit wird das Pilzwachstum beurteilt und darüber die MHK bestimmt.

In dieser Arbeit wurde die Mikrodilution nach den EUCAST-Vorgaben „7.3.1 Method for the determination of broth dilution MIC of antifungal agents for yeasts“ durchgeführt. Dazu wurden zunächst Stocklösungen der Antimykotika Fluconazol (12800 mg/l) und Amphotericin B (800 mg/l) in DMSO hergestellt. Diese wurden dann mittels einer 10-stufigen 1:2-Verdünnungsreihe in DMSO verdünnt und anschließend 1:100 mit zweifach konzentriertem RPMI Medium (mit 2 % Glucose) verdünnt. Das zweifach konzentrierte RPMI Medium mit 2 % Glucose wurde nach EUCAST-Angaben hergestellt, indem RPMI 1640-Pulver, MOPS und Glucose unter stetigem Rühren in sterilem Wasser gelöst wurden. Der pH-Wert wurde anschließend mit 1-molarer Natronlauge auf pH 7,0 gebracht. Vor der

Verwendung wurde das Medium sterilfiltriert und im Kulturautomaten auf Sterilität überprüft (siehe 2.2.3). Jeweils 100 µl der Antimykotika-Verdünnungen wurden schließlich in eine 96-well-Platte pipettiert und mit 100 µl einer Pilzsuspension versetzt.

Zur Herstellung der Pilzsuspension wurden 5 Kolonien, die bei 37 °C für 18 - 48 h auf Sabouraudagar gewachsen waren, in sterilem Wasser gelöst und auf 0,5 McFarland eingestellt (entspricht einer Konzentration von 1×10^5 bis 5×10^5 KBE/ml).

Die beimpfte 96-well-Platte wurde dann für $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ bei 37 °C inkubiert und anschließend mithilfe des BIOMIC-Gerätes abgelesen. Als Kontrollen wurden stets eine Wachstumskontrolle (Medium ohne Antimykotikum) sowie eine Negativ- bzw. Sterilitätskontrolle (nur Medium ohne Pilzsuspension) auf der Platte mitgeführt. Zusätzlich wurde die Pilzsuspension auf Sabouraudagar und Chromagar ausplattiert, um sie auf Reinheit und die richtige Pilzkonzentration zu überprüfen (siehe 2.2.2). Die Mikrodilutionsmethode wurde stets mit drei technischen Replikaten durchgeführt (s. Abb. 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-C (Amp)	4 mg/l	2 mg/l	1 mg/l	0,5 mg/l	0,25 mg/l	0,125 mg/l	0,063 mg/l	0,031 mg/l	0,016 mg/l	0,008 mg/l	pos. <u>Kontr.</u>	neg. <u>Kontr.</u>
D+E												
F-H (Flu)	64 mg/l	32 mg/l	16 mg/l	8 mg/l	4 mg/l	2 mg/l	1 mg/l	0,5 mg/l	0,25 mg/l	0,125 mg/l	pos. <u>Kontr.</u>	neg. <u>Kontr.</u>
<p>Jedes Well enthält 200µl: 100µl doppelt konzentriertes RPMI mit Antimykotikum + 100µl Pilzsuspension</p> <p>Endkonzentrationen Antimykotika: s. Angabe im Well Endkonzentration Pilze: 0,5-2,5 KBE/ml</p> <p>Pos. Kontrolle: Wachstumskontrolle: 100µl doppelt konzentriertes RPMI ohne Antimykotikum + 100µl Pilzsuspension Neg. Kontrolle: Sterilitätskontrolle: 100µl doppelt konzentriertes RPMI + 100µl des für die Pilzsuspension verwendeten Reinstwassers</p>												

Abb. 1: Beispielhafte Plattenbelegung für die Resistenztestung mittels Mikrodilution. Je drei technische Replikate für jedes getestete Antimykotikum. *Amp:* Amphotericin B. *Flu:* Fluconazol

E-Test

Der Epsilon-Test (kurz E-Test) stellt eine alternative Methode zur MHK-Bestimmung dar, die in vielen klinischen Laboratorien wegen des geringeren Arbeitsaufwandes der Mikrodilution vorgezogen wird. Der E-Test-Streifen ist ein länglicher Kunststoffstreifen, dessen Unterseite mit der antimikrobiellen Substanz beschichtet ist, während die Oberseite eine Skala zum Ablesen der MHK-Werte zeigt. Dabei sinkt die Konzentration der Substanz zum unteren Ende des Streifens hin graduell ab.

Zur Durchführung der MHK-Bestimmung mittels E-Test wurde eine RPMI-Agarplatte zweimal gleichmäßig mit einer Erregersuspension (0,5 McFarland, Herstellung s. Mikrodilutionsmethode) bestrichen und der Teststreifen anschließend auf die Platte aufgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 24 - 48 h bei 37 °C zeigte sich ein dichter Pilzrasen. Durch die Diffusion des Antimykotikums in den Nähragar wurde das Wachstum des Pilzes lokal inhibiert, sodass ein ellipsoid-förmiger Hemmhof entstand. Das Ablesen der MHK erfolgte dann am unteren Ende des Hemmhofes.

Bei der Durchführung des Tests wurde streng den Angaben des Herstellers gefolgt, da nur auf diese Weise eine Vergleichbarkeit mit der Referenzmethode Mikrodilution gewährleistet ist. Die Inokulumsuspension wurde bei jedem Test auf die gewünschte Pilzkonzentration von 1×10^6 bis 5×10^6 KBE/ml hin überprüft (s. 2.2.2).

2.2.5 Herstellung des Kornealagerungsmediums

Zur Herstellung des Kornealagerungsmedium wurde MEM-Earle's mit Hespuffer (Endkonzentration 12,5 mM) und Penicillin/ Streptomycin (Endkonzentration 100 U/ 100 µg/ml) versetzt. Je nach Versuchsaufbau wurde dem Medium auch Amphotericin B zugegeben. In den Versuchen kam Medium mit 0,25, 1,25 sowie 2,5 µg/ml Amphotericin B zum Einsatz. Das fertige Medium wurde durch einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert und anschließend direkt verwendet bzw. in sterilen Glasflaschen bei 4 °C lichtgeschützt bis zur Verwendung gelagert.

2.2.6 Versuchsaufbau der Kontaminationsversuche mit *Candida-spp.* in Kornealagerungsmedium

Eine Hauptfragestellung dieser Arbeit ist, welchen Einfluss der Zusatz von Antimykotika zu Kornealagerungsmedium auf die Reduktion möglicher Pilzkontaminationen hat. Um diese Frage zu beantworten, wurden Kontaminationsexperimente durchgeführt.

In einer ersten Versuchsserie wurde Kornealagerungsmedium ohne antimykotische Zusätze mit Medium, das 2,5 µg/ml Amphotericin B enthält, verglichen. Jeweils 6 Probenröhrchen wurden mit 50 ml amphotericinhaltigem bzw. mit amphotericinfreiem Medium gefüllt. Anschließend wurden diese Medien mit unterschiedlichen definierten Konzentrationen an Pilzen kontaminiert.

Dazu wurde eine Übernachtskultur des gewünschten Pilzes zunächst durch Zentrifugieren pelletiert, in Kornealagerungsmedium (ohne Amphotericin B) gewaschen und dann darin resuspendiert. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe, ebenfalls in Kornealagerungsmedium, hergestellt. Die Verdünnungsreihe wurde anschließend genutzt, um durch Hinzufügen von 1 ml der entsprechenden Verdünnungen zu 50 ml Kornealagerungsmedium kontaminierte Proben unterschiedlicher Keimbelastung zu erhalten. Angestrebt wurden dabei Endkonzentrationen von 10^6 , 10^4 , 10^3 , 10^2 bzw. 10 KBE/ml. Die Inokulumsuspensionen wurden durch Keimzahlbestimmung auf die korrekte Konzentration hin überprüft. In das sechste Probenröhrchen wurde 1 ml Korneamedium ohne Pilze gegeben. Diese Probe diente als Negativkontrolle, um eventuelle Kontaminationen der Ausgangssubstanzen bzw. Verunreinigungen während des Experimentes zu detektieren.

Die kontaminierten Medien wurden anschließend lichtgeschützt bei 4 °C (hypotherme Lagerung) oder bei 37 °C (Organkultur) inkubiert. Nach 2 h sowie an den Versuchstagen 3, 5, 7 und 10 wurden je 1 ml Probe entnommen, um die Keimzahl im Medium zu bestimmen (siehe 2.2.2). Außerdem wurden je 2 ml Proben für molekularbiologische Versuche entnommen und bei -80 °C eingefroren. Die weitere Untersuchung dieser Proben ist in dieser Arbeit nicht dargestellt. Zur Thematik der molekularbiologischen Nachweisoptionen in diesem Kontext sei auf die Kapitel 2.2.8, 3.4 und 4.5 verwiesen.

An Tag 5 wurden zusätzlich eine aerobe und eine anaerobe Kulturautomatenflasche mit je 10 ml Probe beimpft, um die konventionelle mikrobiologische Testung in einer Hornhautbank zu simulieren (siehe 2.2.3). Die Probenentnahmezeitpunkte wurden anhand der

Vorgaben in der „Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank“ (Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 2018) ausgewählt. Auch die Dauer des Experimentes orientiert sich an den dortigen Vorgaben: Das Experiment endet nach 10 Tagen, da dann bei organkultivierten Korneae das Medium ausgetauscht werden müsste.

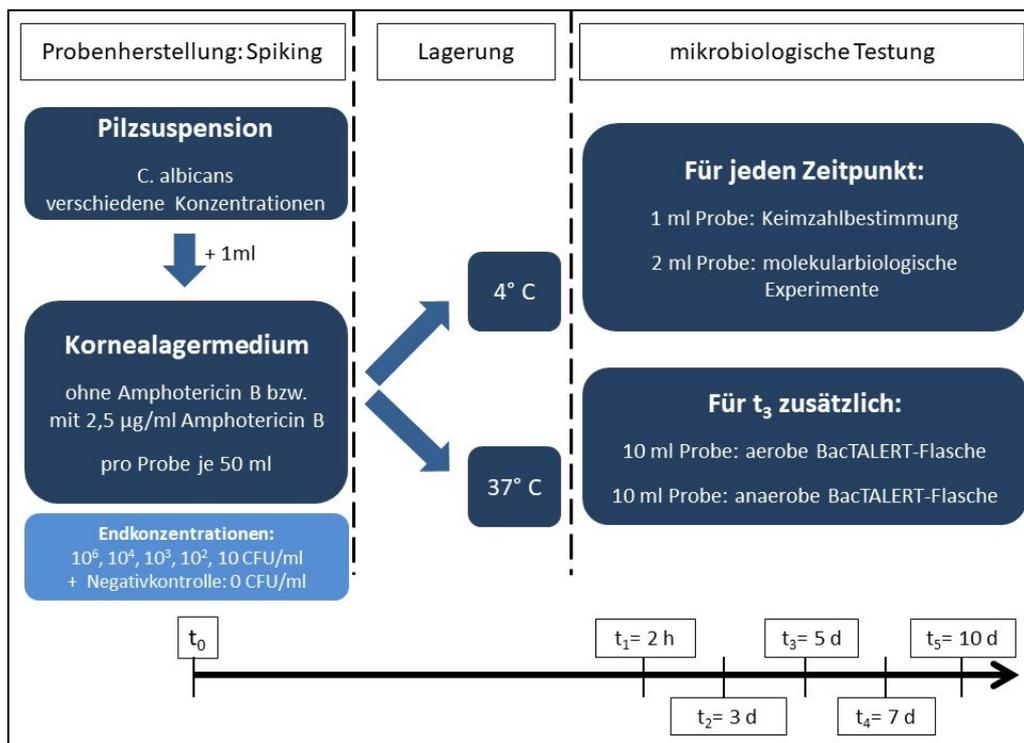


Abb. 2: Übersicht Versuchsaufbau Kontaminationsversuche mit *Candida spp.* in Kornealagerungsmedium. Links: Versetzen von Kornealagermedium mit unterschiedlichen Ausgangsinokula einer Pilzsuspension. Mitte: Lagerbedingungen 4 °C (hypotherme Lagerung) bzw. 37 °C (Organkultur). Rechts: Zeitpunkte und Methoden der mikrobiologischen Testung.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden verschiedene Amphotericinkonzentrationen miteinander verglichen. Dazu wurde Medium mit 0, 0,25, 1,25 bzw. 2,5 µg/ml Amphotericin B verwendet. Die niedrigste und höchste Pilzkonzentration wurde ausgelassen, außerdem fiel die Entnahme von Proben für molekularbiologische Experimente sowie zur Beimpfung von BacTALERT-Flaschen weg (s. Abb. 3).

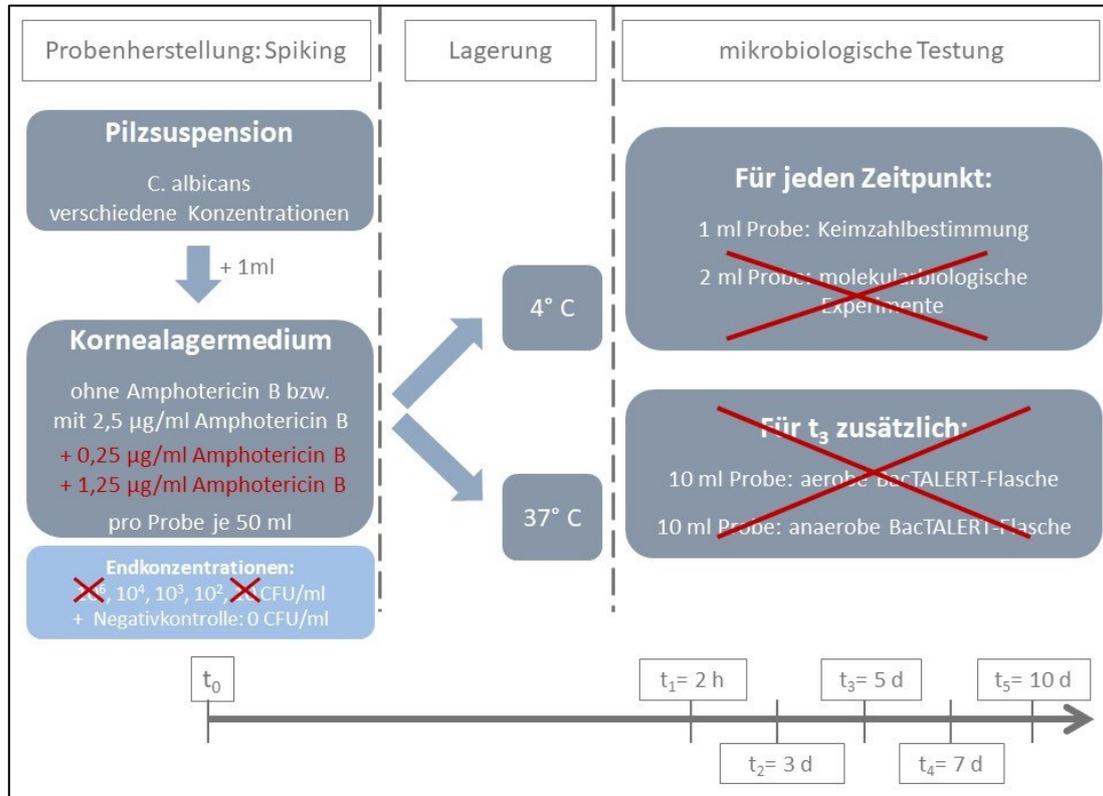


Abb. 3: Übersicht Versuchsaufbau modifizierte Kontaminationsversuche mit *Candida spp.* in Kornealagerungsmedium. Vgl. auch Abb. 2. Modifikationen in Rot dargestellt.

Die hier beschriebenen Versuche wurden alle mit *C. albicans* und zum Teil zusätzlich mit *C. auris* durchgeführt (Details siehe Ergebnisteil). Jedes Versuchssetting wurde dreimal wiederholt.

2.2.7 Versuchsaufbau zur Identifizierung potenzieller Interaktionen zwischen Antimykotika und Kulturautomaten

Die meisten deutschen Hornhautbanken verwenden Kulturautomatensysteme zur vorgeschriebenen mikrobiologischen Testung des Korneamediums. Zur Klärung der Fragestellung, ob Antimykotika im Kornealagerungsmedium die Detektion von Pilzkontaminationen mittels Kulturautomaten stören, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

In 6 aerobe und 6 anaerobe Kulturflaschen wurden je 9 ml Kornea-Kulturmedium ohne Amphotericinzusatz injiziert. In identischer Weise wurden in weitere 6 aerobe und 6 anaerobe Flaschen je 9 ml Medium mit 2,5 µg/ml Amphotericinzusatz injiziert. Zusätzlich wurden die Flaschen anschließend mit 1 ml einer Pilzsuspension beimpft. Diese Pilzsuspension wurde aus einer Übernachtskultur von *Candida albicans* hergestellt. Dazu wurden 10 ml der Übernachtskultur durch Zentrifugieren pelletiert, in 10 ml Kornealagerungsmedium (ohne Amphotericin B) gewaschen und dann darin resuspendiert. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, sodass sich Keimzahlen von 10^6 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10 KBE/ml bezogen auf die insgesamt 10 ml Probe in den Kulturflaschen ergaben (analog zu den unter 2.2.6 beschriebenen Versuchen).

Die Flaschen wurden dann im BacTALERT-Kulturautomaten inkubiert (s.2.2.3). Die Detektionszeiten von Flaschen mit amphotercinhaltigem Medium wurden danach mit denen der Flaschen ohne Amphotericin B im Medium verglichen.

2.2.8 Molekularbiologische Methoden

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene molekularbiologische Methoden auf ihre Anwendbarkeit zur mikrobiologischen Routinetestung von Korneamedium überprüft.

2.2.8.1 DNA-Isolation

Für die molekularbiologischen Versuche dieser Arbeit war es nötig, DNA aus Hefepilzzellen zu isolieren. Die stabile Zellwand von Hefepilzen mit Chitin erschwert dies im Vergleich zur DNA-Isolation aus Bakterien. Als geeignete Methode erwies sich eine Kombination aus enzymatischer Lyse mit dem Enzym „Zymolyase“ (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) und anschließender DNA-Isolation mit dem „Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit“ (Zymo Research, Freiburg, Deutschland), wobei das Protokoll modifiziert wurde.

Dazu wurde die 2 ml umfassende Probe zunächst für 7 min bei 16000 rcf zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, sodass 200 µl Probe im Reaktionsgefäß verblieben. Anschließend erfolgte die Lyse unter Zugabe von 120 µl YD Digestion Buffer und 5 µl Zymolyase bei 37 °C in einem Heizblock für 2 h. Dann wurde das Enzym bei 60 °C für 10 min inaktiviert. Im Anschluss fand die eigentliche DNA-Isolation statt. Dazu wurde die Probe mit 1200 µl Lysepuffer gemischt, für 2 min bei 16000 rcf zentrifugiert und der Überstand anschließend auf die Silicasäule in einem Auffanggefäß aufgetragen. Wegen des großen Probenvolumens erfolgte das Auftragen auf die Säule aufgeteilt auf zwei Durchläufe. Die Säule mit aufgetragener Probe wurde jeweils bei 10000 rcf 1 min zentrifugiert und das Auffanggefäß zwischen den zwei Durchläufen geleert. Dann wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt und erst mit 200 µl Pre-Waschpuffer und dann mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem Aufbringen des jeweiligen Waschpuffers erfolgte wieder eine Zentrifugation bei 10000 rcf für 1 min. Nach dem Waschvorgang wurde das Auffanggefäß geleert und die Säule erneut für 10 s darin zentrifugiert, um sie von überschüssigem Waschpuffer zu befreien. Abschließend wurde 15 µl Elutionspuffer direkt auf die Säule in einem 1,5 ml Low-DNA-binding-Reaktionsgefäß aufgetragen, für 1 min inkubiert und dann für 30 s bei 10000 rcf zentrifugiert.

Die Ausbeute und Reinheit der so gewonnenen DNA wurde anschließend durch eine spektralphotometrische Messung im NanoDrop™ One überprüft.

Alle DNA-Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.8.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Dabei synthetisiert die DNA-Polymerase den komplementären Strang zum zu vervielfältigenden DNA-Einzelstrang. Der zu amplifizierende Bereich der DNA wird durch die Zugabe von Primern, kurzen DNA-Stücken mit definierter Basenabfolge, bestimmt. Die Amplifikation erfolgt in Zyklen, wobei die Menge der DNA-Fragmente sich (optimale Bedingungen vorausgesetzt) durch jeden Zyklus verdoppelt, d.h. insgesamt exponentiell ansteigt. Die PCR kommt in vielen diagnostischen Bereichen zum Einsatz, in

der mikrobiologischen Routinetestung von Korneamedium findet sie jedoch noch keine breite Anwendung. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten deshalb verschiedene PCR-basierte Experimente:

Im ersten Schritt wurde eine ITS (internal transcribed spacer) – PCR durchgeführt. Die ITS (internal transcribed spacer) -Region ist die am häufigsten zur Identifizierung von Pilzen verwendete Region. Sie ist zwischen den rRNA-Genen lokalisiert und kommt daher in allen Pilzspezies vor. Sie umfasst die Regionen ITS1 und ITS2 und kann durch Verwendung verschiedener Primer, welche in den angrenzenden Regionen binden können, gezielt amplifiziert werden. Eins der am häufigsten eingesetzten Primerpaare zur Pilzdetektion ist das Paar ITS1 + ITS4, welches von White et al. (1990) etabliert wurde. Diese Primer binden an die rRNA-Gene 18S (ITS1) bzw. 28S (ITS4) und amplifizieren damit die gesamte Region bestehend aus ITS1, 5.8S und ITS2 (vgl. Abb. 4).

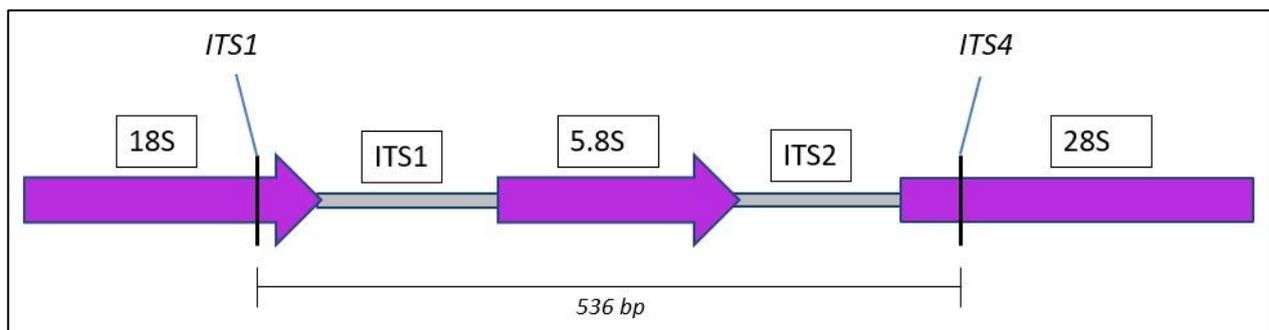


Abb. 4: Lokalisation der ITS (internal transcribed spacer) -Region zwischen den rRNA-Genen 18S, 5.8S und 28S und Position der zur Amplifikation dieser Region verwendeten Primer ITS1 und ITS4. Ein so erzeugtes Amplikon enthält ITS1 und ITS2 und hat eine erwartete Länge von 536 bp. *Abbildung angelehnt an White et al. (1990).*

Orientierend an White et al. (1990) wurde eine PCR mit den Primern ITS1 und ITS4, *Candida albicans*-DNA und untenstehendem PCR-Ansatz und -Programm durchgeführt (vgl. Tab. 13 und 14).

Tab. 13: PCR-Ansatz zur Amplifikation der ITS-Region mit den Primern ITS1 und ITS4. Volumenangaben jeweils pro Probe.

Taq DNA Polymerase 10x Buffer	5 µl
dNTP-Mix 10 mM	1 µl
Forward Primer (ITS1) 10 µM	2,5 µl
Reverse Primer (ITS4) 10 µM	2,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DNA (5 ng/µl)	4 µl
Nuklease-freies Wasser	34,8 µl
Total	50 µl

Tab. 14: PCR-Programm zur Amplifikation der ITS-Region mit den Primern ITS1 und ITS4

Initiale Denaturierung	95° C	5 min
Denaturierung	95° C	30 s
Anlagerung	55° C	1 min
Elongation	72° C	1 min
Finale Elongation	72° C	6 min

35 Zyklen

Im nächsten Schritt wurde das Detektionslimit dieser Methode bestimmt. Dazu wurde aus einer Übernachtskultur von *C. albicans* eine 1:10 Verdünnungsreihe in Natriumchloridlösung hergestellt, aus der dann mit der oben beschriebenen Methode (2.2.8.1) DNA isoliert wurde. Die PCR erfolgte analog zum oben beschriebenen Ansatz und Programm, jedoch wurden pro Verdünnungsstufe einmal 2 µl und einmal 4 µl DNA-haltige Probe verwendet.

Die nächste Fragestellung umfasste potentielle Störfaktoren der DNA-Isolation bzw. PCR-Methode. Dazu wurde die oben beschriebene PCR erneut wiederholt, jedoch mit anders gewonnenen DNA-Proben: Zur Überprüfung der Störfaktoren Korneamedium bzw. Amphotericin B wurde Korneamedium (mit 2,5 µg/ml Amphotericin B und ohne Amphotericin B) mit verschiedenen Mengen *Candida albicans* versetzt (analog zu den unter 2.2.6 beschriebenen Versuchen) und daraus DNA für die PCR isoliert.

Eine ITS-PCR kann das Vorhandensein von Pilzen in einer Probe nachweisen. Eine eindeutige Identifikation der Pilzspezies ist ohne nachfolgende Sequenzierung jedoch nicht möglich. Deshalb wurde auch ein spezifischer PCR-Ansatz zum Nachweis von *Candida albicans* überprüft. Dabei kamen insgesamt 5 Primerpaare zum Einsatz, die an *Candida albicans*-spezifische Gensequenzen binden (*RBT4*, *RIM8*, *BGL2*, *MNT1*, *GNA1*). Die Reaktionen wurden jeweils als Singleplex-PCR-Reaktionen durchgeführt. PCR-Ansatz und Programm wurden wie folgt gewählt:

Tab. 15: PCR-Ansatz für PCR mit spezifischen *Candida albicans*-Primern. Volumenangaben jeweils pro Probe.

10x ThermoPol Reaction Puffer	5 µl
dNTP-Mix 10 mM	1 µl
Forward Primer 10 mM	0,5 µl
Reverse Primer 10 mM	0,5 µl
Vent exo Polymerase 2 U/µl	0,5 µl
DNA (5 ng/µl)	4 µl
Nuklease-freies Wasser	38,5 µl
Total	50 µl

Tab. 16: PCR-Programm für PCR mit spezifischen *Candida albicans*-Primern

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Anlagerung	55 °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	3 min

35 Zyklen

In einem letzten Schritt wurden die gewonnenen Erkenntnisse aus obenstehenden Versuchen auf die Testung klinischer Proben angewendet. Dazu wurden uns von der Hornhautbank der Charité - Universitätsklinik Berlin insgesamt 16 durch Kontamination aufgefallene und somit zur Transplantation ungeeignete Hornhäute in ihrem Aufbewahrungsmedium zur Verfügung gestellt.

Aus zwei dieser Proben wurde exemplarisch mit dem oben beschriebenen Verfahren DNA isoliert. Anschließend erfolgte eine ITS-PCR mit den Primern ITS1 und ITS4 nach oben beschriebenem Ansatz und Programm. Mit diesen DNA-Proben wurde außerdem auch die *Candida albicans*-spezifische PCR mit 5 verschiedenen Primerpaaren (s. oben) getestet.

Aus den restlichen 14 Proben wurde mithilfe des „Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit“ (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben DNA isoliert. Anschließend erfolgte eine ITS-PCR mit dem Primerpaar ITS1 und ITS4 (s. oben).

2.2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zum Auftrennen und Sichtbarmachen von PCR-Produkten verwendet. Dazu wurde ein 1 %iges Agarosegel mit TAE-Puffer gegossen. Anschließend wurde die Probe 5:1 mit DNA-Ladepuffer gemischt und je nach verwendetem Gelkamm 5 bzw. 10 µl in eine Tasche pipettiert. Zum Größenvergleich wurde mindestens eine Tasche mit einem DNA-Größenmarker gefüllt (ebenfalls 5:1 mit DNA-Ladepuffer gemischt). Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 1 h 30 min. Dann wurde das Gel für 20 min in ein Ethidiumbromidbad (5 µg/ml) gelegt. Zum Sichtbarmachen der Banden wurde das Gel anschließend im Chemidoc-Gerät mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt und fotografiert.

2.2.8.4 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Die quantitative real-time PCR (qPCR) ist eine Variante der PCR, die es ermöglicht, die Amplifikation in Echtzeit anhand eines Fluoreszenzsignals von DNA-interkalierenden Farbstoffen oder fluoreszierenden DNA-Sonden zu verfolgen. Je nach Handhabung sind Rückschlüsse auf die ursprüngliche DNA- und Erregermenge in der Probe möglich. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Nachweis der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese oder ein vergleichbares Verfahren nicht obligat ist.

In dieser Arbeit wurde ein DNA-Polymerase-Mastermix mit SYBR Green® verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert sequenzunspezifisch in die amplifizierte doppelsträngige DNA. Durch die zunehmende Anzahl an DNA-Doppelsträngen mit jedem Zyklus erhält man ein zur Menge Doppelstrang-DNA proportional zunehmendes Fluoreszenzsignal bei 530nm über die Dauer der PCR. Als Ergebnis erhält man einen Ct-Wert (cycle threshold), welcher derjenigen Anzahl an Temperaturzyklen entspricht, nach welcher das Fluoreszenzsignal in einer Probe einen definierten Schwellenwert überschreitet. Dieser Wert spiegelt die Menge ursprünglich in der Probe enthaltener DNA wider.

Die qPCR wurde in 96-well-Platten nach untenstehendem Ansatz und Protokoll durchgeführt (Tab. 17 und 18). Als DNA-Proben wurde *C. albicans*-DNA verwendet, welche aus mit unterschiedlichen Keimzahlen *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium isoliert wurde (Details vgl. Kapitel 3.6).

Tab. 17: Ansatz qPCR. Volumenangaben jeweils pro Probe.

SYBR Green Master Mix	10 µl
Forward Primer 10 µM (ITS1)	1 µl
Reverse Primer 10 µM (ITS4)	1 µl
<i>C. albicans</i> -DNA-Probe	2 µl
Nuclease-Free Water	6 µl
Total	20 µl

Tab. 18: Programm qPCR

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	10 s
Anlagerung	55 °C	20 s
Elongation	72 °C	15 s
Finale Elongation	72 °C	3 min

45 Zyklen

Bei jeder PCR-Reaktion wurde eine DNA-Standardreihe mit definierten DNA-Mengen mitgeführt. Die Standardreihe dient zur Kontrolle der jeweiligen PCR-Reaktion und

ermöglicht zugleich eine Quantifizierung der DNA-Menge in den untersuchten Proben durch Abgleich der Ct-Werte mit denen der Standardreihe. Für die Standardreihe wurden jeweils 10^{-5} ng bis 10 ng *C. albicans*-DNA eingesetzt (vgl. Abb. 5).

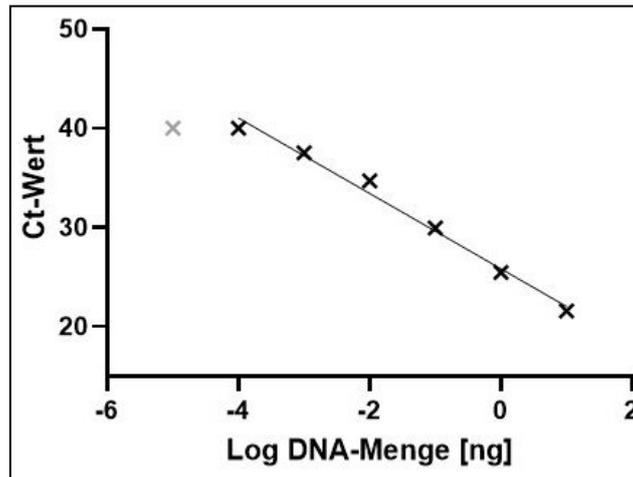


Abb. 5: Exemplarische Darstellung einer Standardreihe (lineare Regression) bei der qPCR. Verwendet wurden die Primer ITS1 und ITS4 sowie verschiedene Mengen *C. albicans* DNA (10^{-5} ng bis 10 ng). qPCR Ansatz und Protokoll vgl. Tab. 17 und 18. *Hinweis: Die dargestellte Standardreihe dient der Veranschaulichung der Methode. Wegen der nicht optimalen Effizienz der qPCR wurde der Datenpunkt 10^{-5} ng DNA ausgeschlossen und die Standardreihe nicht zur Berechnung von DNA-Mengen aus Ct-Werten verwendet (vgl. Kapitel 4.6).*

2.2.8.5 Nanoporen-Sequenzierung

Als alternative und zukunftsweisende molekularbiologische Technologie wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Sequenzierung von DNA-Proben aus kontaminiertem Kornea-medium getestet. Sequenzierungsmethoden bieten unter anderem den Vorteil, dass die Spezies von Kontaminanten bestimmt sowie ggf. Informationen über Resistenzgene gewonnen werden können. Zur Sequenzierung wurde ein MinION-Gerät von Oxford Nanopore Technologies verwendet, bei dem die Nanoporen-Sequenziertechnik zum Einsatz kommt. Sie basiert auf einer Membran mit Nanoporen, an welcher ein elektrischer Strom angelegt wird. Die Passage von DNA-Stücken durch die Nanoporen führt zu einer

Änderung des Ionenstromes durch die Poren. Aus den charakteristischen Ionenstromveränderungen wird dann die genaue Abfolge der vier Nukleinbasen ermittelt.

Für diese Arbeit wurde der folgende Versuchsablauf gewählt:

1. PCR

Als DNA-Vorlage wurde aus künstlich kontaminiertem Korneamedium (vgl. Versuche Abschnitt 2.2.6) isolierte *C. albicans*- und *C. auris*- DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit einer ITS-PCR mit dem Primerpaar ITS1 und ITS4 sowie einer *Candida albicans*-spezifischen Multiplex-PCR mit 4 Primerpaaren (vgl. Tab. 19, 20 und 21) amplifiziert. Alle verwendeten Primer für diese PCRs waren phosphoryliert, d.h. sie weisen einen Monophosphat-Anhang am 5'-Ende auf. Dies ist für die anschließende Ligation der Sequenzieradapter essentiell.

Tab. 19: PCR-Ansatz ITS-PCR für Sequenzierung. Volumenangaben jeweils pro Probe.

Long Amp MM	25 µl
Forward Primer ITS1 10 µM	1 µl
Reverse Primer ITS4 10 µM	1 µl
DNA-Probe	2 µl
Nuclease-freies Wasser	21 µl
Total	50 µl

Tab. 20: PCR-Ansatz Multiplex-PCR *C. albicans*. Verwendete Primer: RBT4 FF+RV, RIM8 FF+RV, GNA1 FF+RV, BGL2 FF+RV. Volumenangaben jeweils pro Probe.

Long Amp MM	25 µl
4 Forward Primer 10 µM	Je 1 µl
4 Reverse Primer 10 µM	Je 1 µl
DNA-Probe	2 µl
Nuclease-freies Wasser	15 µl
Total	50 µl

Tab. 21: PCR-Programm Sequenzierungs-PCR

Initiale Denaturierung	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	20 s
Anlagerung	55 °C	30 s
Elongation	65 °C	2 s

35 Zyklen

2. Messung auf Tapestation

Das Tapestation-System ermöglicht eine automatisierte Elektrophorese von Nukleinsäuren. Es liefert genaue Angaben zur Größe der amplifizierten PCR-Produkte sowie zu ihrer Menge/Konzentration. Verglichen mit einer konventionellen Gelelektrophorese bietet es einen deutlichen Zeitvorteil (Analysezeit ca. 2 min + Probenvorbereitung) sowie eine standardisierte und detaillierte Probenanalyse.

Zur Untersuchung der PCR-Produkte für die Sequenzierung wurde das D1000 Screen-Tape verwendet, welches zur Analyse doppelsträngiger DNA-Moleküle mit einer Länge von 35 bis 1000 bp geeignet ist. Die Probenvorbereitung und Messung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben unter Verwendung der zugehörigen Reagenzien D1000 Ladder und D1000 Sample Buffer (Agilent Technologies).

3. Library-Präparation (Adapterligation) für Sequenzierung mit MinION

Damit die PCR-Produkte an Nanoporen binden und durch die Poren geleitet werden können, müssen sie an ihren Enden mit Sequenzieradaptern versehen werden. Zur Ligation der Adapter wurden die hierfür relevanten Teile des Herstellerprotokolls „Amplicons by Ligation“ mit dem Ligation-Sequencing-Kit LSK109 („Adapter ligation and clean-up“) verwendet. Dabei ligiert eine T4-Ligase die nötigen Adapter an die phosphorylierten PCR-Produkte. Dann erfolgt eine Aufreinigung mittels paramagnetischer Beads, an die die DNA bindet, sodass überschüssige Bestandteile aus der Probe entfernt werden können.

4. Beladen der Flowcell

Für die Sequenzierung wurde eine Flongle-Flowcell verwendet, das kleinste Flowcell-Format des Herstellers. Die Flongle-Flowcell wurde nach Angaben des Herstellers Oxford Nanopore Technologies mit dem „Flow Cell Priming Kit“ vorbereitet. Anschließend wurde die vorbereitete DNA-Library (s.o.) mit „Loading Beads“ und „Sequencing Buffer“ nach Protokoll des Herstellers gemischt und die Flowcell damit beladen. Dann erfolgte der Sequenzierungsvorgang im MinION-Gerät.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mit GraphPad Prism 8 bzw. 9 sowie Microsoft Excel 2019 durchgeführt. Soweit in der Methodenbeschreibung nicht anders beschrieben, erfolgten alle Experimente stets in technischen Triplikaten sowie dreifacher Versuchsdurchführung.

Bei den Experimenten zur Beobachtung der Pilzzellkonzentrationen in Medium über die Zeit wurden die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Pilzzellkonzentrationen aus drei Versuchsdurchläufen gebildet und über die Zeit dargestellt. Das Detektionslimit wurde definiert als 70 KBE/ml, da darunter eine zuverlässige Zählung und Hochrechnung der Koloniezahlen nicht mehr möglich war.

Bei den Experimenten im Kulturautomaten erfolgte die Datenauswertung zum Vergleich der Detektionszeiten in An- bzw. Abwesenheit von Amphotericin B mittels ANOVA mit Messwiederholung und Bonferroni post-hoc Test. Es wurde von einer Normalverteilung der gemessenen Detektionszeiten ausgegangen. P-Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Die Auswertung der Daten aus der Nanoporen-Sequenzierung erfolgte mittels des institutsintern etablierten Datenprozessierungssystems zur Verarbeitung von Sequenzierrohdaten.

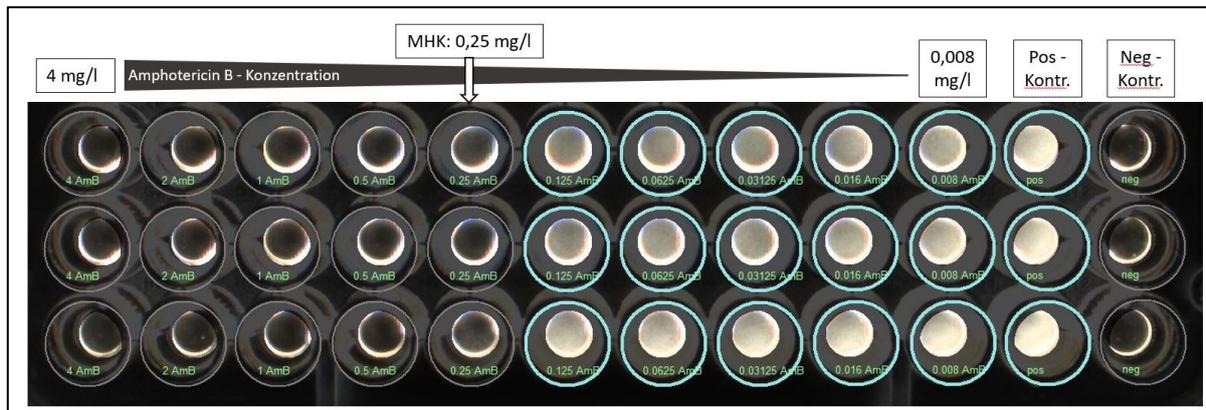
3 Ergebnisse

3.1 Resistenzbestimmung verschiedener *Candida*-Stämme gegen Amphotericin B und Fluconazol

Den Untersuchungen von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium wurde zunächst eine Resistenztestung der verwendeten Pilzstämme vorangestellt, um mit Hilfe etablierter Standardmethoden die Empfindlichkeit gegenüber Antimykotika zu bestimmen. Getestet wurden verschiedene Stämme der Arten *C. albicans*, *C. auris* und *C. glabrata* hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den antimykotischen Substanzen Fluconazol und Amphotericin B. Die Testung erfolgte mittels E-Test. Für die Stämme *C. albicans* (ATCC 10231) sowie *C. auris* (DSM 21092) erfolgte zusätzlich eine vergleichende Testung mittels Mikrodilution. Die Mikrodilutionsplatten wurden dabei gemäß EUCAST-Vorgaben abgelesen: Für Amphotericin B entspricht die MHK der niedrigsten Konzentration, die eine 90%ige Wachstumsinhibierung im Vergleich zur Wachstumskontrolle ergibt, während für Fluconazol nur eine 50%ige Wachstumsinhibierung erreicht werden muss. Die Mikrodilution wurde jeweils in 3 Replikaten durchgeführt. Details zur Durchführung und Plattenbelegung sind in Kapitel 2.2.4 beschrieben (vgl. dort Abb. 1).

Die Ergebnisse der Resistenztestungen sind exemplarisch in den Abb. 6 und 7 dargestellt sowie in Tab. 22 zusammengefasst.

A



B

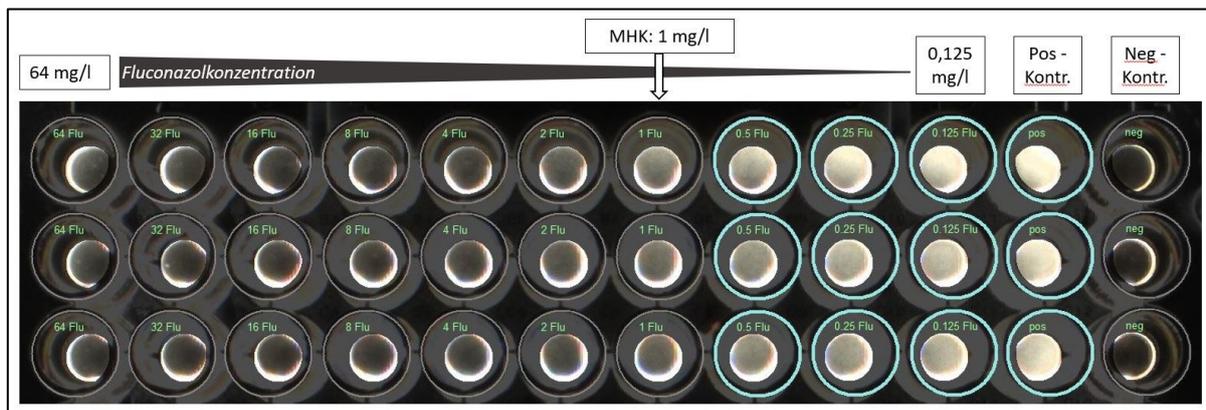


Abb. 6, A+B: MHK-Bestimmung mittels Mikrodilutionsmethode für *C. auris* (DSM 21092) und Amphotericin B bzw. Fluconazol. $n=3$. **A:** Amphotericin B. Ermittelte MHK: 0,25 mg/l. **B:** Fluconazol. Ermittelte MHK: 1 mg/l. *Neg-Kontr.:* Negativkontrolle (Sterilitätskontrolle). *Pos-Kontr.:* Positivkontrolle (Wachstumskontrolle).



Abb. 7: Exemplarische Darstellung der MHK-Bestimmung mittels E-Tests. *C. auris* (DSM 21092) abgelesen nach 48 h. Links: Fluconazol, MHK: 1,00 mg/l. Rechts: Amphotericin B, MHK: 0,19 mg/l.

Die Abweichungen zwischen ermittelter MHK durch E-Test, Mikrodilution bzw. Referenzwert der Stämme aus der CDC-Datenbank waren insgesamt gering und betrug maximal eine Verdünnungsstufe (Ausnahme *C. glabrata*, CDC AR#0320 + Fluconazol, hier 2 Verdünnungsstufen Differenz). Die Stämme *C. albicans* ATCC 10231 und *C. auris* DSM 21092 konnten als empfindlich gegenüber beiden getesteten Antimykotika eingestuft werden, während die beiden *C. auris*-Stämme CDC AR#0389 und CDC AR#0390 hohe MHKs für beide Antimykotika zeigten. Für *C. auris* gibt es derzeit keine gültigen EUCAST-Breakpoints. Werden die vorläufigen Empfehlungen der CLSI zu Rate gezogen, müssten die beiden Stämme als resistent eingestuft werden (vgl. Tab. 22). Die zwei *C. glabrata* Stämme konnten als sensibel gegenüber Amphotericin B bewertet werden. Für Fluconazol erfolgte die Einordnung als „resistent“ beim Stamm CDC AR#0318 und als „I“ bzw. „empfindlich bei gesteigerter Exposition“ für den Stamm CDC AR#0320 (vgl. Tab. 22). Die Breakpoints entsprechen den revidierten EUCAST-Definitionen und -Vorgaben von 2019 bzw. 2020 (EUCAST, 2020b).

Tab. 22: Übersicht über die ermittelten MHK-Werte aller getesteten Stämme mit den Methoden Mikrodilution (nur 2 Stämme, jeweils n=3) und E-Test (jeweils n=1). Angegeben sind, soweit vorhanden, außerdem Referenzwerte, Breakpoints (nach EUCAST) sowie Interpretation der ermittelten Werte unter Berücksichtigung der geltenden Breakpoints. Für *C. auris* existieren bisher **keine** gültigen EUCAST-Breakpoints. In der Tabelle sind deshalb die vorläufigen Empfehlungen des CLSI angegeben.

Amp B: Amphotericin B, Flu: Fluconazol, S: sensibel, R: resistent, I: empfindlich bei gesteigerter Exposition.

Spezies Stamm	Antimykotikum	E-Test (mg/l)	Mikrodilution (mg/l)	Referenzwert (mg/l)	Breakpoints (mg/l)	Interpretation
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Amp B	0,38	0,5	-	$S \leq 1 < R$	S
	Flu	0,25	0,5	-	$S \leq 2; R > 4$	S
<i>C. auris</i> DSM 21092	Amp B	0,19	0,25	-	$R \geq 2$	S
	Flu	1,00	1,00	-	$R \geq 32$	S
<i>C. auris</i> CDC AR#0389	Amp B	3	-	4	$R \geq 2$	R
	Flu	>256	-	256	$R \geq 32$	R
<i>C. auris</i> CDC AR#0390	Amp B	3	-	4	$R \geq 2$	R
	Flu	>256	-	>256	$R \geq 32$	R
<i>C. glabrata</i> CDC AR#0318	Amp B	0,25	-	0,19	$S \leq 1 < R$	S
	Flu	48	-	32	$S \leq 0,001$ $R > 16$	R
<i>C. glabrata</i> CDC AR#0320	Amp B	0,25	-	0,19	$S \leq 1 < R$	S
	Flu	2	-	4	$S \leq 0,001$ $R > 16$	I

Wegen der klinischen Relevanz (vgl. Kapitel 1.1.2 und 1.2.4) sowie der ermittelten MHK wurde zunächst *C. albicans* ATCC 10231 als Versuchskeim gewählt, um den Effekt von Amphotericin B auf die Bioburdenreduktion von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium zu untersuchen. Eine Durchführung dieser Untersuchungen mit resistenten Stämmen ist aufgrund des zunehmenden Vorkommens solcher Stämme für weiterführende Arbeiten ebenfalls interessant. (Perlin et al., 2017; Sanguinetti et al., 2015).

3.2 Kontaminationsversuche mit *Candida spp.* in Kornealagerungsmedium

3.2.1 Bioburdenreduktion durch 2.5 µg/ml Amphotericinzusatz in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium

Im ersten Experiment wurde die Bioburden-Reduktion durch Amphotericinzusatz (2,5 µg/ml) in mit *C. albicans* experimentell versetztem Kornealagerungsmedium ermittelt (vgl. Kapitel 2.2.6 und dort insbesondere Abb. 2). Dazu erfolgte ein direkter Vergleich der Keimzahlentwicklung in Medium mit und ohne Amphotericin B (vgl. Abb. 8).

Es zeigte sich, dass die Pilzkeimzahl in Medium ohne Amphotericinzusatz bei hypothermer Lagerung (4 °C) über den Untersuchungszeitraum von 10 Tagen konstant blieb. In amphotericinhaltigem Medium (2,5 µg/ml) konnte hingegen ein Abfall der Pilzkeimzahlen beobachtet werden. Abhängig vom initialen Inokulum dauerte es unterschiedlich lange, bis die Zellzahl unter die Detektionsgrenze des Assays (70 KBE/ml) fiel. Lediglich beim höchsten Inokulum (initial 10^6 KBE/ml) blieb die Pilzkeimzahl über den gesamten Zeitraum im detektierbaren Bereich und betrug am zehnten Tag ca. 630 KBE/ml (vgl. Abb. 8, A+B).

Der gleiche Versuchsaufbau bei 37 °C (Organkulturbedingungen) ergab ein anderes Bild: Im Medium ohne antimykotische Zusätze stieg die Keimzahl in den ersten 5 Tagen des Beobachtungszeitraums, vor allem in den Proben mit initial geringen Pilzkonzentrationen (10, 10^2 , 10^3 KBE/ml), deutlich an. Die Proben mit initial 10 KBE/ml Pilzen erreichten einen Anstieg um insgesamt 4 \log_{10} -Stufen. Ab Tag 5 stabilisierten sich die Keimzahlen auf konstant hohem Niveau. Bei den Proben mit initial höheren Pilzkonzentrationen (10^4 , 10^6 KBE/ml) fiel die Zunahme der Keimzahl geringer aus. In amphotericinhaltigem Medium erfolgte ein rascher Abfall der Keimzahlen. Bereits nach 2 h (initial 10, 10^2 KBE/ml) bzw. an Tag 3 (initial 10^3 , 10^4 KBE/ml) waren keine Pilze mehr in den Proben nachweisbar. Dies blieb über den restlichen Zeitraum unverändert. Lediglich die Proben mit einer initialen Konzentration von 10^6 KBE/ml wichen davon ab: Hier zeigte sich zwar ebenfalls zunächst ein deutlicher Rückgang der Keimzahlen, jedoch stiegen sie in der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraumes wieder an (vgl. Abb. 8, C+D). Bei dieser hohen Pilzkonzentration schien die Amphotericinkonzentration von 2.5 µg/ml demnach nicht auszureichen, um die Pilze zu eliminieren bzw. längerfristig das Wachstum zu unterdrücken.

Die Negativkontrollen (Kornealagerungsmedium ohne Pilzinokulum) blieben in allen Fällen über den gesamten Zeitraum frei von Pilzen und anderen Erregern.

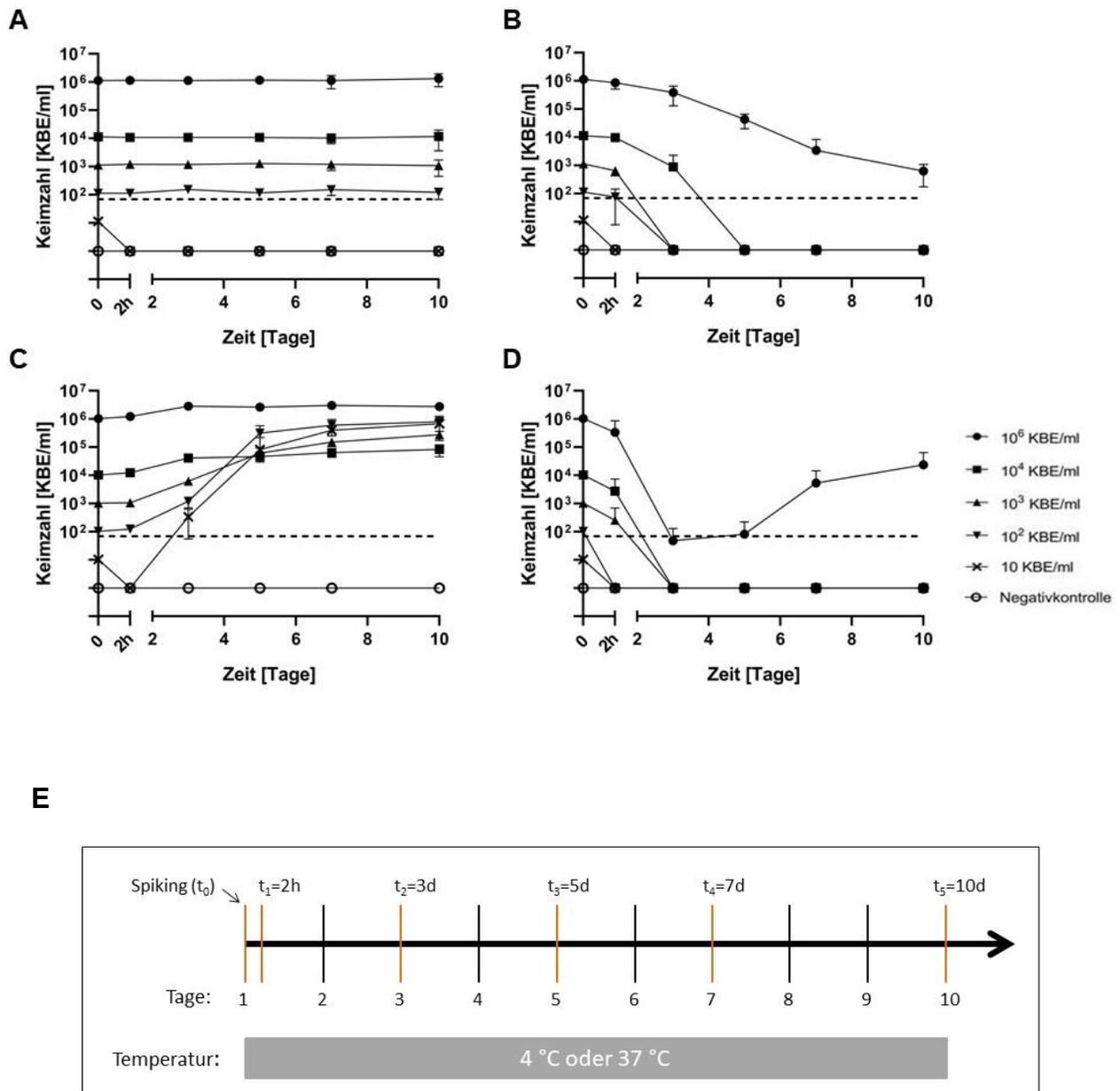


Abb. 8, A-E: Entwicklung der *C. albicans* Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium mit bzw. ohne 2,5 µg/ml Amphotericin B bei verschiedenen Lagertemperaturen. $n=3$. **A:** 4 °C-Lagerung, Medium ohne Amphotericin B, **B:** 4 °C-Lagerung, Medium mit 2,5 µg/ml Amphotericin B, **C:** 37 °C-Lagerung, Medium ohne Amphotericin B, **D:** 37 °C-Lagerung, Medium mit 2,5 µg/ml Amphotericin B, **E:** Zeitstrahl des Versuchsablaufs. *Detektionslimit 70 KBE/ml (gestrichelte Linie in A-D).*

Im Rahmen des oben geschilderten Versuchs erfolgte an Tag 5 auch die Beimpfung von Bact/ALERT-Kulturflaschen zum Vergleich mit der in Hornhautbank üblichen automatisierten mikrobiologischen Testung von Kornealagerungsmedium. Der Kulturautomat

detektiert das Pilzwachstum anhand des von ihnen freigesetzten CO₂, welches zum Farbumschlag eines Sensors am Flaschenboden führt. Die Detektionszeiten (engl.: „Time-to-Detection“) sind in Abb. 9 dargestellt.

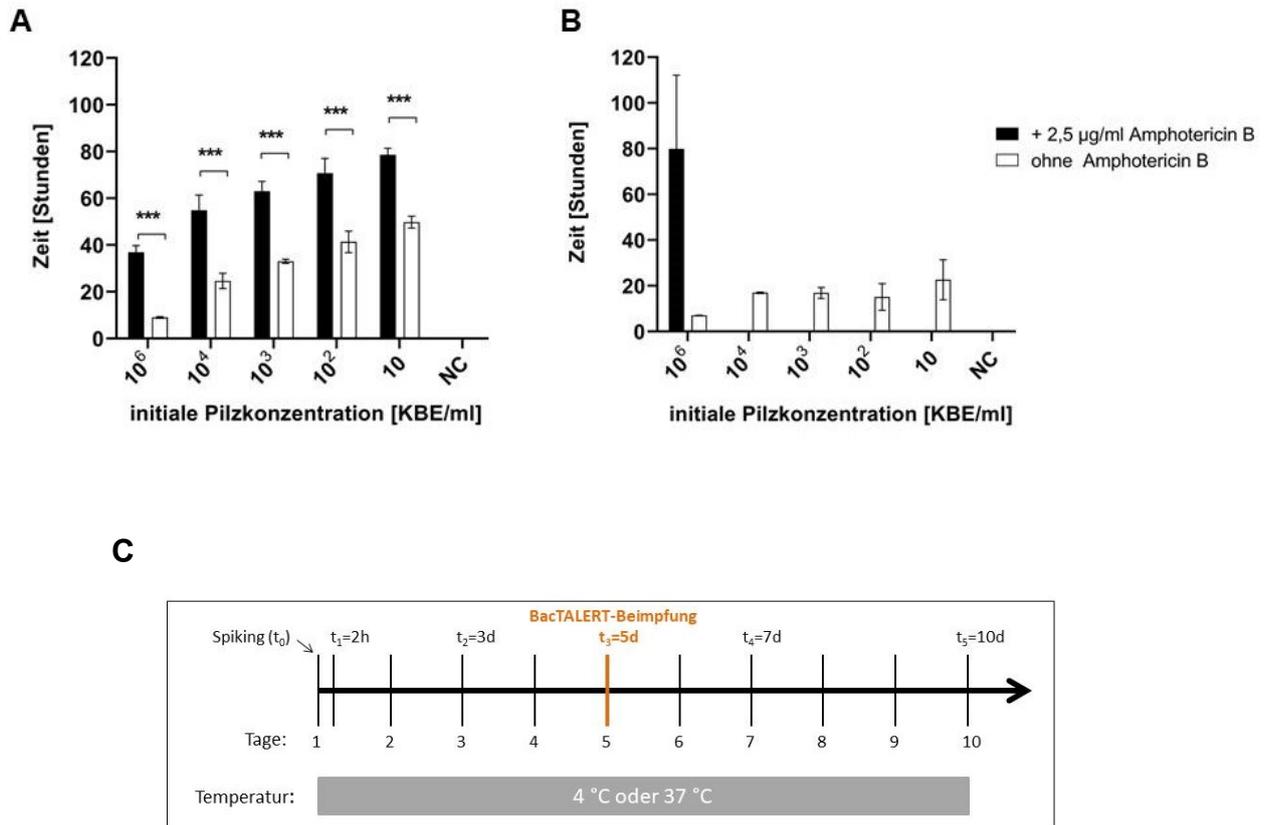


Abb. 9, A-C: *C. albicans* Detektionszeiten (engl.: „Time-to-Detection“) in aeroben BacT/ALERT Kulturautomatenflaschen im Rahmen des Kontaminationsversuchs (vgl. Abb. 8). Die Kulturautomatenflaschen wurden mit an Tag 5 des Kontaminationsversuchs entnommenen Proben beimpft. Es handelt sich demnach um Proben von mit definierten Pilzkonzentrationen versetztem Kornealagerungsmedium nach 5 d Lagerung bei 4 °C bzw. 37 °C. Ist kein Wert abgebildet, wurde die Flasche bis zum Ende des Detektionszeitraumes (7 d) nicht als „positiv“ erkannt und somit als „negativ“ bewertet. n=3. **A:** Proben aus Kontaminationsversuch bei hypothermer Lagerung (4 °C). **B:** Proben aus Kontaminationsversuch bei Organkulturbedingung (37 °C). **C:** Zeitstrahl des Versuchsablauf. NC: Negativkontrolle (Kornealagerungsmedium ohne Pilzinokulum), *** P<0,0001

Alle aeroben Kulturautomatenflaschen des Experimentes, die mit hypotherm gelagertem (4 °C) kontaminiertem Kornealagerungsmedium beimpft wurden (Abb. 9 A), konnten vom Kulturautomaten als kontaminiert detektiert werden. An Tag 5 des

Kontaminationsversuchs müssen sich demnach in allen Proben noch vermehrungsfähige Pilze befunden haben. Die Detektionszeiten betragen bei den Proben aus amphotericinhaltigem Medium 37 - 79 h und bei den Proben aus amphotericinfreiem Medium 9 - 50 h. Damit dauerte die Detektion der Proben aus amphotericinhaltigem Medium signifikant länger. Dies ist gut mit den oben dargestellten Ergebnissen der Keimzahlbestimmungen vereinbar, die für Tag 5 niedrigere Keimzahlen im amphotericinhaltigen verglichen mit amphotericinfreiem Medium zeigten. Wie zu erwarten, stieg die Detektionszeit für beide Medien in negativer Korrelation zur initialen Pilzkeimzahl an, d.h. je niedriger das Pilzinokulum zu Beginn des Spikingexperimentes, desto länger war die Detektionszeit im Kulturautomaten. Von den anaeroben Flaschen (nicht in Abb. 9 dargestellt) wurden lediglich diejenigen mit amphotericinhaltigem Medium und initialem Inokulum von 10^6 KBE/ml als kontaminiert erkannt. Dies geschah im Mittel nach ca. 21 h, also früher als bei den entsprechenden aeroben Kulturflaschen. Die Rolle anaerober Kulturflaschen wird in Kapitel 4.2.1 behandelt.

Bei Beimpfung der Kulturflaschen mit gespiktem Kornealagerungsmedium, welches zuvor unter Organkulturbedingungen (37 °C) gelagert wurde, wurde in allen aeroben Kulturflaschen mit amphotericinfreiem Medium Pilzwachstum detektiert. Die Detektionszeiten betragen dabei 7-23 h und waren damit deutlich niedriger als die Detektionszeiten im entsprechenden Experiment mit Proben aus hypothermaler Lagerung (s.o.) Bei der Betrachtung der Flaschen mit amphotericinhaltigem Medium zeigt sich, dass lediglich die Proben mit einem initialen Inokulum von 10^6 KBE/ml als kontaminiert erkannt wurden. Die Detektionszeit betrug hier ca. 80 h. In allen amphotericinhaltigen Flaschen mit niedrigeren initialen Pilzkonzentrationen konnte kein Pilzwachstum mehr detektiert werden. Es ist davon auszugehen, dass am Tag der Flaschenbeimpfung (Tag 5 des Kontaminationsversuchs) in diesen Proben bereits alle Pilze durch das Vorhandensein von Amphotericin B eliminiert worden waren (vgl. Abb. 9 B). Diese Ergebnisse passen zu den in Abb. 8 C+D dargestellten Ergebnissen der Keimzahlbestimmung, die für amphotericinfreies Medium hohe Keimzahlen zeigten (hier niedrige Detektionszeiten) und für amphotericinhaltiges Medium bis auf Inokulum 10^6 KBE/ml eine Reduktion der Keimzahlen unterhalb des Detektionslimits (hier negative BacT/ALERT-Flaschen). Die Detektionszeiten der anaeroben Flaschen variierten recht stark und sind nur im Anhang (Abb. 22) dargestellt, da sie für einen primär

aerob wachsenden Pilz wie *C. albicans* nur begrenzt aussagekräftig sind. Ihre Bedeutung wird in Kapitel 4.2.1 aufgegriffen.

In keiner der Negativkontrollen (Kornealagerungsmedium ohne Pilzinokulum) wurde Erregerwachstum detektiert.

3.2.2 Bioburdenreduktion durch niedrigere Amphotericin B-Konzentrationen (0,25 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5, µg/ml) in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium

Der Einfluss niedrigerer Amphotericinkonzentrationen auf die Bioburdenreduktion in Kornealagerungsmedium wurde ebenfalls untersucht. Verwendet wurde Medium mit 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml und 0,25 µg/ml Amphotericin B, wie es in einigen Hornhautbanken praktiziert wird, sowie amphotericinfreies Medium.

Der bisherige Versuchsaufbau wurde dafür leicht angepasst (vgl. Kapitel 2.2.6 und dort insbesondere Abb. 3): Die niedrigste initiale Pilzkonzentration wurde ausgelassen, da eine Keimzahl von 10 KBE/ml mit der gewählten Methode zur Keimzahlbestimmung nicht detektiert werden konnte. Auch die höchste initiale Pilzkonzentration von 10^6 KBE/ml wurde weggelassen, da diese keine realistische Keimbelastung eines Transplantats darstellt. Außerdem wurde die Probenentnahme auf die Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren beschränkt, die Entnahme von Proben für molekularbiologische Experimente sowie zur Beimpfung von BacT/ALERT-Flaschen fiel bei dieser Versuchsserie weg.

Die Ergebnisse sind in Abb. 10 (4°C) sowie Abb. 11 (37°C) dargestellt.

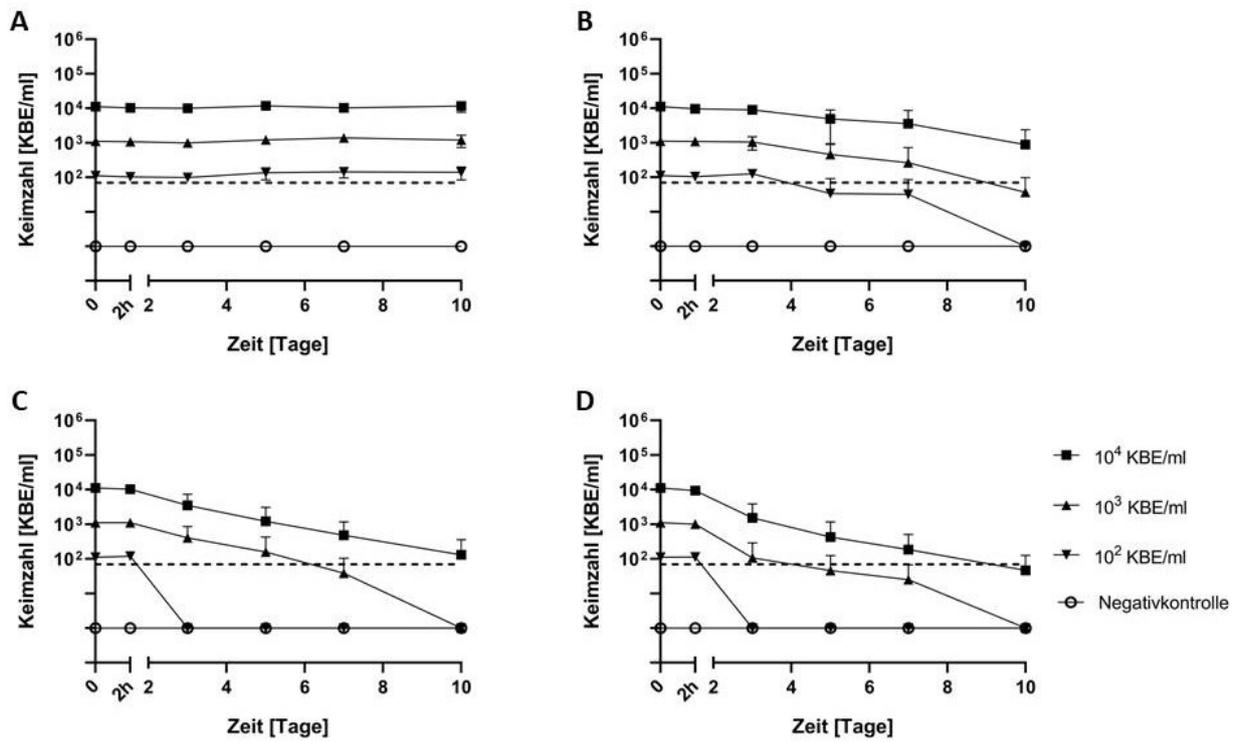


Abb. 10, A-D: Entwicklung der *C. albicans* Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium mit verschiedenen Amphotericinkonzentrationen bei hypothermer Lagerung (4 °C). n=3. **A:** ohne Amphotericin B, **B:** 0,25 μ g/ml Amphotericin B, **C:** 1,25 μ g/ml Amphotericin B, **D:** 2,5 μ g/ml Amphotericin B.

Detektionslimit 70 KBE/ml (gestrichelte Linie).

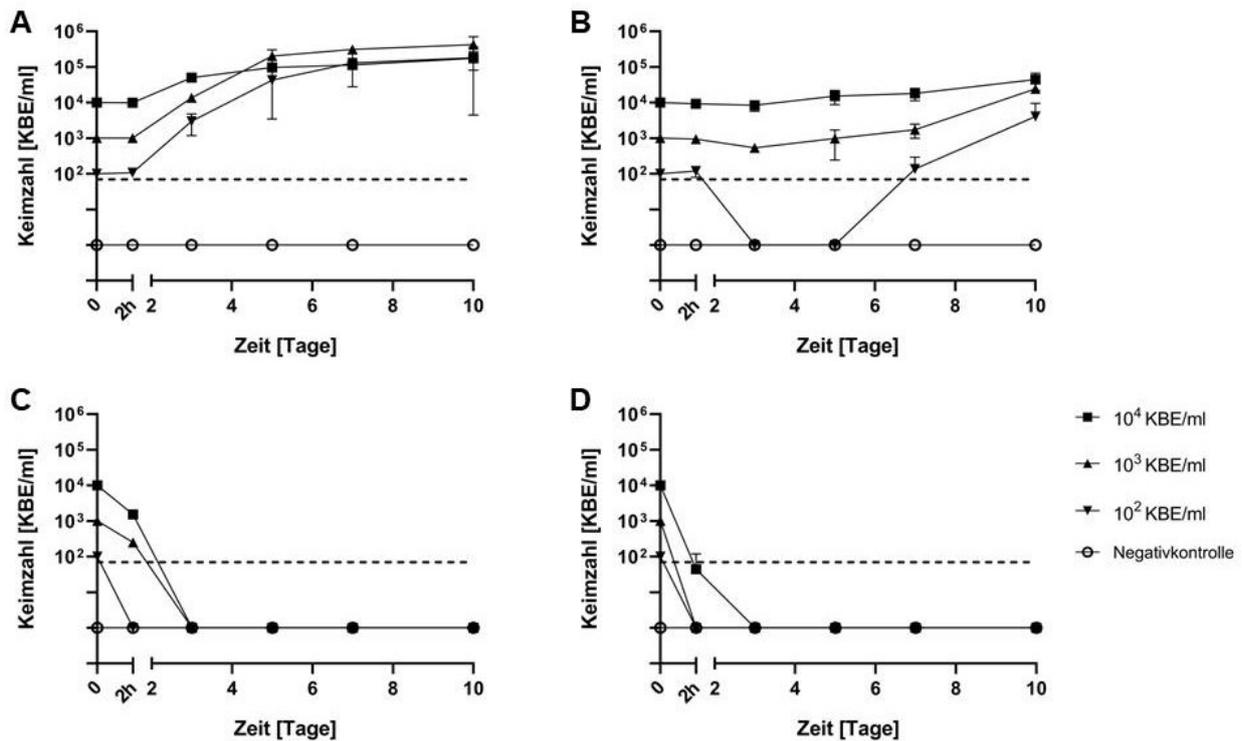


Abb. 11, A-D: Entwicklung der *C. albicans* Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium mit verschiedenen Amphotericinkonzentrationen bei Organkulturbedingungen (37 °C), dargestellt gruppiert nach Amphotericinkonzentration. n=3. **A:** ohne Amphotericin B, **B:** mit 0,25 μ g/ml Amphotericin B, **C:** mit 1,25 μ g/ml Amphotericin B, **D:** mit 2,5 μ g/ml Amphotericin B. Detektionslimit 70 KBE/ml (gestrichelte Linie).

Es bestätigte sich die Beobachtung aus der ersten Versuchsreihe, dass die Keimzahl unter hypothermen Bedingungen in amphotericinfreiem Medium konstant bleibt (vgl. Abb. 10 A mit Abb. 8 A). Bei Verwendung von antimykotikumhaltigem Medium zeigte sich eine Abnahme der Keimzahl über die Zeit. Die Geschwindigkeit der Keimzahlreduktion war abhängig von der Amphotericin B-Konzentration. Sie hing darüber hinaus auch von der Ausgangskeimzahl ab. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die Bioburdenreduktion bei allen verwendeten Amphotericin B-Konzentrationen nur moderat war. Eine vollständige Eliminierung der Pilze wurde, insbesondere bei niedrigen Amphotericin B-Konzentrationen, nicht erreicht.

Im Vergleich dazu ergab sich bei der Betrachtung der Entwicklung der Keimzahlen in Kornealagerungsmedium unter Organkulturbedingungen (37 °C), dass die Gegenwart von 1,25 μ g/ml sowie 2,5 μ g/ml Amphotericin B zu einer raschen Elimination der Pilze führte.

An Tag 3 waren, unabhängig vom Ausgangsinokulum, in keiner der Proben Pilze nachweisbar (vgl. Abb. 11 C+D). Die niedrigere Konzentration von 0,25 µg/ml hingegen reichte nicht aus, um eine Pilzelimination zu erreichen (vgl. Abb. 11 B). In Kombination mit einem Pilzinokulum von 10^4 bzw. 10^3 KBE/ml konnte hier lediglich die Zunahme der Keimzahl gehemmt werden. Im Falle eines Inokulums von 10^2 KBE/ml kam es zwar zwischenzeitlich zur Reduktion der Keimzahlen unterhalb der Detektionsgrenze der hier verwendeten Nachweismethode, jedoch konnte in der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraumes beobachtet werden, wie die verbliebenen Pilzzellen sich wieder vermehrten. Ab Tag 5 war einen deutlichen Anstieg der Keimzahl zu erkennen, sodass am Ende des Beobachtungszeitraumes sogar eine höhere Keimzahl als das Ausgangsinokulum erreicht wurde. Dies hängt möglicherweise mit der begrenzten Stabilität von Amphotericin B unter Organkulturbedingungen zusammen.

Ein deutlicher Anstieg der Keimzahlen war bei Verwendung von amphotericinfreiem Medium zu beobachten (vgl. Abb. 11 A), wie dies auch schon beim oben beschriebenen Versuchssatz (Kapitel 3.2.1) unter Organkulturbedingungen der Fall war (vgl. Abb. 8 C).

Zum vereinfachten Vergleich der verschiedenen Konzentrationen stellt Abb. 12 die identischen Datensätze in veränderter Anordnung dar: Die Entwicklung der Keimzahlen ist für jedes Pilzinokulum in einem eigenen Diagramm abgebildet. Für alle drei initialen Inokula (10^2 , 10^3 , 10^4 KBE/ml) ist deutlich zu erkennen, dass nur die beiden höheren Amphotericinkonzentrationen 2,5 µg/ml und 1,25 µg/ml zu einer zuverlässigen Keimreduktion führten.

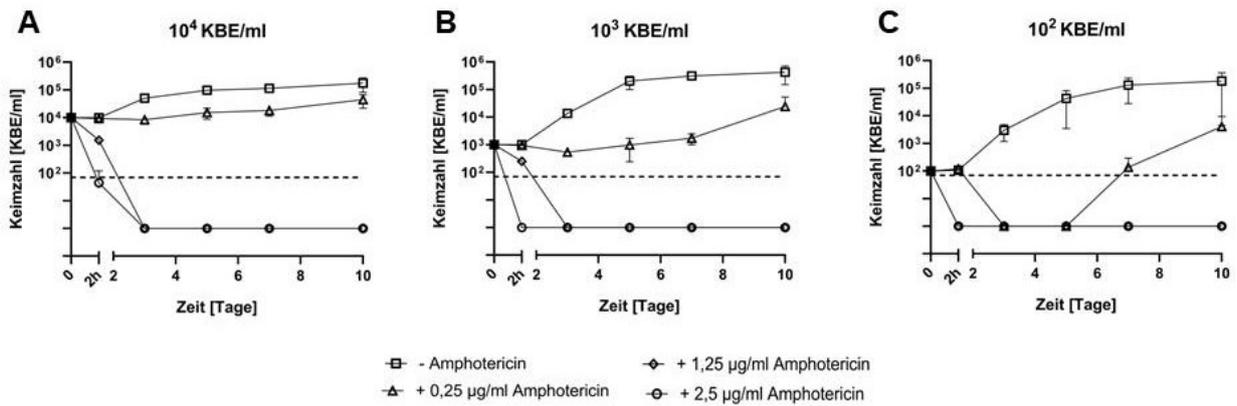


Abb. 12, A-C: Entwicklung der *C. albicans* Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium mit verschiedenen Amphotericinkonzentrationen (0,25 μ g/ml, 1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml und amphotericinfrei) bei Organkulturbedingungen (37 °C), dargestellt gruppiert nach initialem Inokulum. n=3. **A:** initiale Pilzkonzentration 10^4 KBE/ml, **B:** initiale Pilzkonzentration 10^3 KBE/ml, **C:** initiale Pilzkonzentration 10^2 KBE/ml. *Detektionslimit 70 KBE/ml (gestrichelte Linie) Beachte: Es handelt sich um dieselben Daten wie in Abb. 11.*

3.2.3 Bioburdenreduktion durch 2,5 μ g/ml Amphotericinzusatz in experimentell mit *C. auris* versetztem Kornealagerungsmedium

Das oben beschriebene Experiment zur Untersuchung der Bioburdenreduktion durch 2,5 μ g/ml Amphotericin B in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium (vgl. Kapitel 3.2.1 und dort Abb. 8 A+B) wurde auch mit *C. auris* (DSM 21092) durchgeführt. Der Versuchsaufbau blieb hierbei beschränkt auf die Untersuchung bei hypothermer Lagerung (4 °C). Die Keimzahlentwicklung unterschied sich dabei nicht wesentlich von den oben dargestellten Ergebnissen mit *C. albicans* (vgl. Anhang Abb. 23, S. 104).

Analog zum oben beschriebenen Versuch mit *C. albicans* (vgl. Kapitel 3.2.1), wurden an Tag 5 des Versuchs Proben des mit *C. auris* versetzten Kornealagerungsmedium entnommen und in Kulturautomatenflaschen gegeben. Dies ist angelehnt an das übliche Vorgehen zur mikrobiologischen Sterilitätstestung in Hornhautbanken. In Abb. 13 sind analog zu Abb. 9 die Detektionszeiten für die aeroben BacT/ALERT-Flaschen dargestellt. In allen Flaschen wurde *C. auris* nachgewiesen, die Detektionszeit war hierbei erneut abhängig vom Ausgangsinokulum und betrug hier zwischen 50 und 168 h für amphotericinhaltiges

Medium und 19 bis 135 h für amphotericinfreies Medium. Beim Vergleich dieser Detektionszeiten mit den entsprechenden Zeiten bei Verwendung von *C. albicans* (vgl. Abb. 9 A), fällt auf, dass *C. auris* deutlich langsamer detektiert wurde.

Als Negativkontrollen dienten Kulturflaschen, die mit Kornealagerungsmedium ohne Pilzzellen beimpft wurden. In diesen Flaschen wurde vom Kulturautomaten kein Wachstum von Mikroorganismen nachgewiesen.

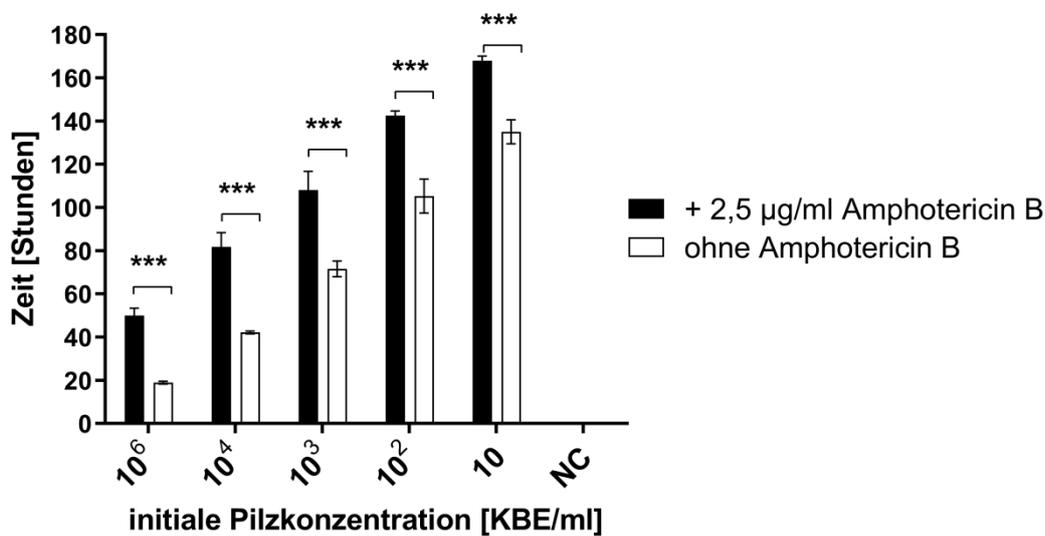


Abb. 13, A+B: *C. auris* Detektionszeiten (engl.: „Time-to-Detection“) für aerobe BacT/ALERT Kulturautomatenflaschen im Rahmen des Kontaminationsversuchs (vgl. Anhang Abb. 23). Die Kulturautomatenflaschen wurden mit an Tag 5 des Kontaminationsversuchs entnommenen Proben beimpft. Es handelt sich demnach um Proben von mit definierten Pilzkonzentrationen versetztem Kornealagerungsmedium nach 5 d Lagerung bei 4 °C. Nach Ende des Inkubationszeitraums (7 d) waren in den Negativkontrollen keine Pilzzellen nachweisbar.

NC: Negativkontrolle (Kornealagerungsmedium ohne Pilzinokulum), *** $P < 0,0001$

3.3 Identifizierung von potenziellen Beeinträchtigungen der mikrobiologischen Testung im Kulturautomaten durch Antimykotika

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit die Reduktion von Kontaminanten durch den Einsatz von Antimykotika in Kornealagerungsmedium untersucht wurden, widmeten sich die folgenden Experimente der Frage, inwiefern das Vorhandensein von Antimykotika im Kornealagerungsmedium die Detektion von Kontaminationen durch konventionelle kulturbasierte mikrobiologische Testmethoden stört. Dazu wurde Kornealagerungsmedium experimentell mit 10 bis 10^6 KBE/ml *C. albicans* versetzt, jeweils unter Verwendung von amphotericinhaltigem ($2,5 \mu\text{g/ml}$) und amphotericinfreiem Medium. Die auf diese Weise hergestellten Proben wurden in Kulturautomatenflaschen gegeben und im BacT/ALERT-Kulturautomaten untersucht (vgl. Abb. 14).

Im Gegensatz zu den Kulturflaschenbeimpfungen im Rahmen der oben beschriebenen Experimente (vgl. Abb. 9 und 13) ist hier zu betonen, dass Medium und Pilzsuspension direkt in die Flasche gegeben wurden, also nicht wie bei den vorangegangenen Experimenten erst nach 5 Tagen Lagerung bei entsprechenden Bedingungen. Im Gegensatz zu obigen Versuchen zielt dieses Experiment nicht auf die Simulation der mikrobiologischen Sterilitätstestung in Hornhautbanken ab, sondern soll potenzielle Interaktionen von Amphotericin B mit der automatischen Sterilitätstestung aufdecken. Die Pilzkonzentrationen entsprechen bei diesem Versuch also den tatsächlich in die Kulturautomatenflasche injizierten Konzentrationen und sind nicht durch die 5-tägige Einwirkung von Amphotericin B bzw. Lagerungstemperatur beeinflusst.

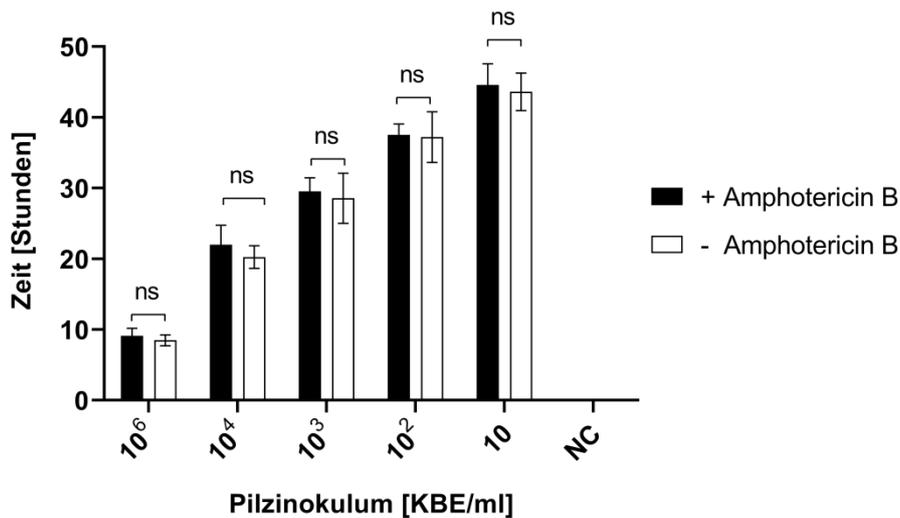


Abb. 14: *C. albicans* Detektionszeiten („Time-to-Detection“) in aeroben BacT/ALERT Kulturautomatenflaschen in An- bzw. Abwesenheit von Amphotericin B. Kornealagerungsmedium wurde experimentell mit verschiedenen Inokula (10^6 – 10 KBE/ml) *C. albicans* versetzt und in die Kulturautomatenflaschen gegeben. Die Detektionszeiten bei Verwendung amphoterichaltigen Mediums (2,5 µg/ml) und amphoterichfreien Mediums wurden verglichen. Nach Ende des Inkubationszeitraums (7 d) waren in den Negativkontrollen (Kornealagerungsmedium ohne *C. albicans*) keine Pilzzellen nachweisbar. NC: Negativkontrolle, ns: nicht signifikant ($p=0,307$)

Abb. 14 stellt die Detektionszeiten aerober Flaschen für die verschiedenen Pilzkonzentrationen dar. Zwei benachbarte Säulen ermöglichen jeweils den Vergleich von amphoterichhaltigem und amphoterichfreiem Medium. Der Vergleich der Detektionszeiten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Medien. Die Detektionszeiten wichen maximal 2 h voneinander ab. Mit abnehmender eingesetzter Pilzkonzentration war ein gradueller Anstieg der Detektionszeiten zu beobachten. Das höchste Inokulum (10^6 KBE/ml) wurde nach ca. 9 h detektiert, das niedrigste (10 KBE/ml) nach ca. 44-45 h.

Die anaeroben Flaschen blieben im Wesentlichen ohne Befund, lediglich in den mit 10^6 KBE/ml oder 10^4 KBE/ml beimpften Flaschen wurde teilweise Pilzwachstum detektiert (nicht dargestellt). Zur Rolle der anaeroben Flaschen vgl. Kapitel 4.2.1.

Unter diesen Bedingungen ist somit keine relevante Interaktion von Amphotericin B mit der Detektionsmethode zu beobachten.

3.4 Nachweis von Pilzkontaminationen durch nukleinsäurebasierte Methoden als Alternative zur mikrobiologischen Testung

3.4.1 Erprobung des Nachweises von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurden die Anwendbarkeit und potenziellen Vor- und Nachteile von Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) zum Nachweis der DNA von Pilzkontaminanten in Kornealagerungsmedium untersucht. Dazu wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zunächst die *internal transcribed spacer* Regionen 1 und 2 der Eukaryonten sowie nachfolgend speziesspezifische Gensequenzen amplifiziert und die entstandenen PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese visualisiert (vgl. Kapitel 2.2.8.2 und dort Abb. 4: „ITS-Region und Position der verwendeten Primer“).

Abb. 15 zeigt das 536 bp lange PCR-Produkt der Amplifikation mit den Primern ITS1 und ITS4 und *C. albicans*-DNA aus einer Übernachtskultur. Es konnte gezeigt werden, dass die PCR mit der geläufigen Kombination der Primer ITS1 und ITS4 unter den hier gewählten PCR-Konditionen und der durch die gewählte Methode der DNA-Isolation erzielten DNA-Qualität für den Nachweis von Pilzen angewendet werden kann.

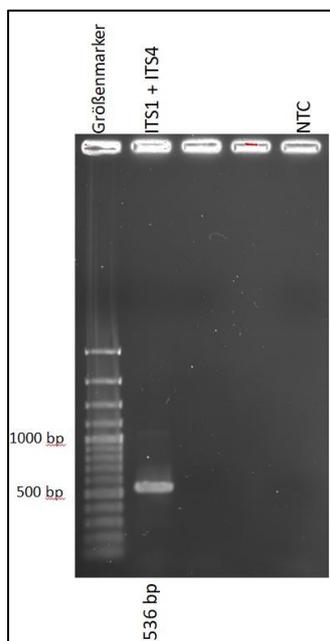


Abb. 15: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten der eukaryotischen ITS-Region, amplifiziert mit Primerpaar ITS1 + ITS4. DNA aus *Candida albicans*-Übernachtskultur. NTC: Non-template-control.

Im nächsten Schritt wurden die Versuchsbedingungen der realen Beschaffenheit der entnommenen Proben in Hornhautbanken angenähert. Dazu wurde Kornealagerungsmedium mit unterschiedlichen Keimzahlen von *C. albicans* kontaminiert (10^6 - 10 KBE/ml), im Anschluss DNA isoliert und diese in eine PCR-Reaktion mit den Primern ITS1 und ITS4 eingesetzt (Abb. 16).

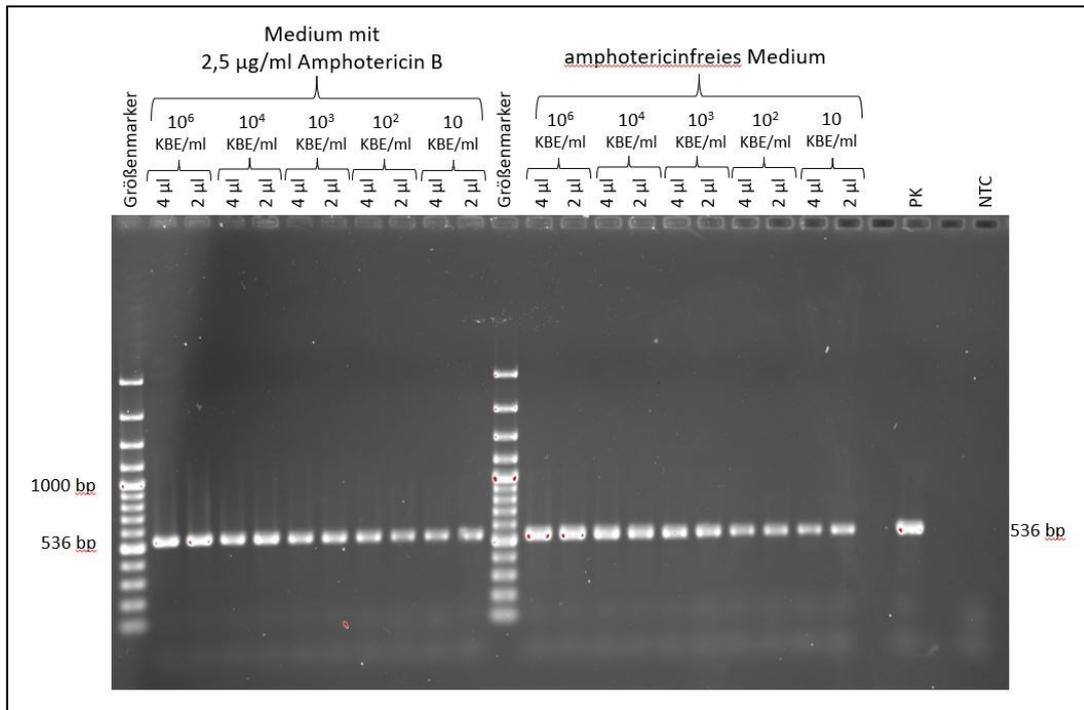


Abb. 16: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten nach PCR mit Primerpaar ITS1 + ITS4 und DNA-Proben (jeweils 2 µl bzw. 4 µl) isoliert aus experimentell mit verschiedenen definierten (10^6 – 10 KBE/ml) *C. albicans* - Konzentrationen versetztem Kornealagerungsmedium (amphotericinhaltig bzw. amphotericinfrei).

PK: Positivkontrolle (*C. albicans*-DNA aus Übernachtskultur). *NTC*: Non-template-control.

Die durchgehende Detektion in allen Proben zeigt, dass das Kornealagerungsmedium bei der DNA-Isolation nicht relevant gestört hat. Zudem scheinen die DNA-Präparationen sowohl aus Proben mit amphotericinfreiem wie auch amphotericinhaltigem Lagerungsmedium frei von PCR Inhibitoren gewesen zu sein. Die gewählte Methode ist daher für die Detektion von Pilzkontaminanten in Kornealagerungsmedium geeignet.

Gleichzeitig wurde mit diesem Experiment auch das Detektionslimit der ITS-PCR am Beispiel von *C. albicans* in Kornealagerungsmittel ermittelt. Es konnte aus den Proben mit

der niedrigsten Keimzahlkonzentration (10 KBE/ml) ausreichend DNA gewonnen werden, um die PCR erfolgreich durchzuführen. Auf dem Gelelektrophoresebild zeigte sich kein sichtbarer Unterschied zwischen 2 µl und 4 µl eingesetzter DNA-haltiger Probe. Diese Beobachtung war in mehreren PCR-Ansätzen reproduzierbar (nicht dargestellt). Das Experiment lässt somit den Schluss zu, dass die Detektionsgrenze dieser Methode (DNA-Isolation aus Kornealagerungsmedium mit definierter Keimzahl und nachfolgender PCR unter den beschriebenen Bedingungen) bei unter 10 KBE/ml liegt.

Im nächsten Schritt sollte am Beispiel von *C. albicans* die Detektion mittels verschiedener Spezies-spezifischer Gensequenzen, deren Transkripte Einfluss auf die Pathogenität haben, ermöglicht werden. Dazu wurden *C. albicans*-spezifische PCR-Primer für die Gene *RBT4*, *RIM8*, *BGL2*, *MNT1* und *GNA1* verwendet. Abb. 17 zeigt die PCR-Produkte bei Verwendung dieser Primer und *C. albicans*-DNA aus einer Übernachtskultur.

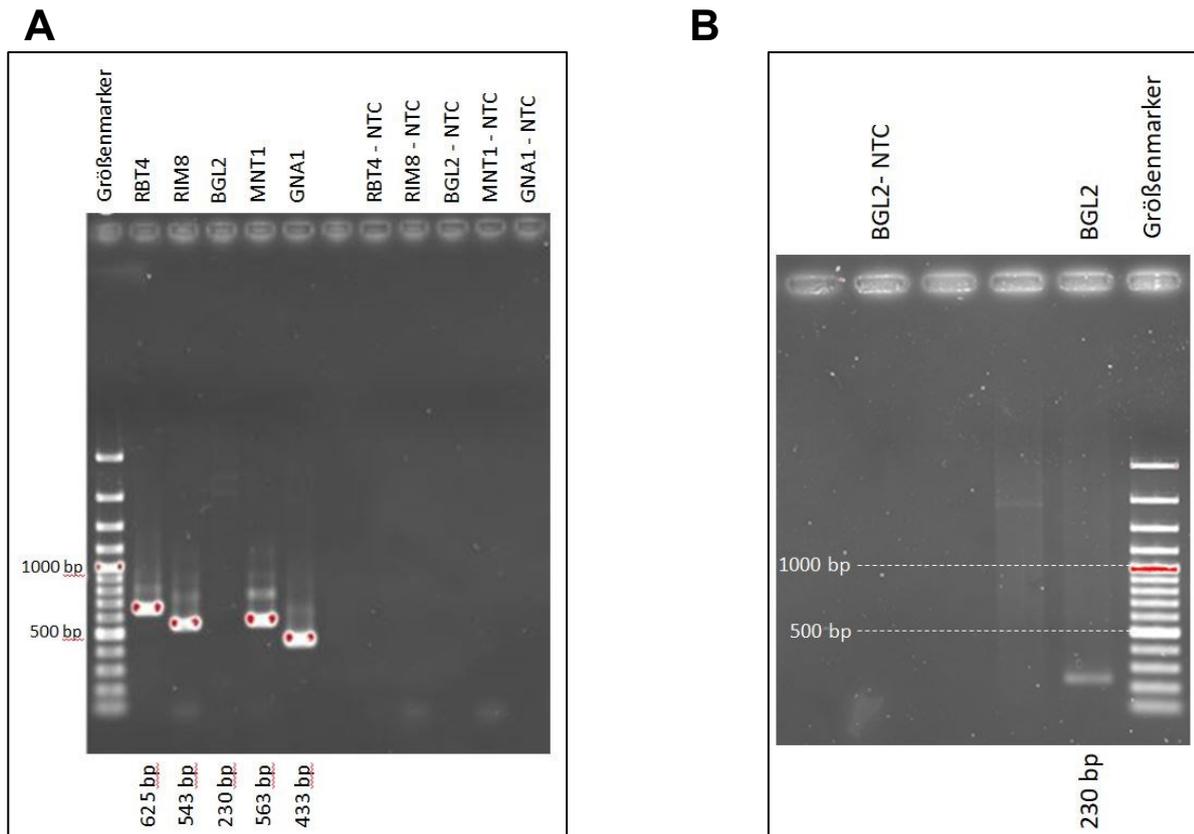


Abb. 17, A+B: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten bei Verwendung von *C. albicans*-spezifischen Primerpaaren und *C. albicans*-DNA aus Übernachtkultur zur Amplifikation von *RBT4*, *RIM8*, *BGL2*, *MNT1*, *GNA1*. **A:** PCR Produkte der angegebenen spezies-spezifischen Virulenzgene mit Angabe der zu erwartenden Fragmentlänge. Links mit *C. albicans*-DNA, rechts Negativkontrolle (nukleasefreies Wasser statt *C. albicans*-DNA) für jedes Zielgen. **B:** Wiederholung der PCR für *BGL2* unter identischen Bedingungen. *NTC*: Non-template-control.

In Abb. 17 A konnte kein PCR Produkt für *BGL2* detektiert werden, nach Wiederholung unter unveränderten Bedingungen konnte das PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 17 B). Alle PCR-Produkte wiesen die jeweils erwartete Fragmentlänge auf. Alle Negativkontrollen (ohne DNA) wiesen kein PCR-Produkt auf. Dies spricht für eine spezifische Amplifikation der einzelnen Produkte. Damit konnte gezeigt werden, dass auch der spezifische Nachweis von *Candida albicans* mit den fünf verwendeten Primerpaaren für die Spezies-spezifischen Virulenzgene unter den im Methodenteil geschilderten PCR-Bedingungen gelingt.

3.4.2 Nachweis von Pilzkontaminationen in klinischen Kornealagerungsmedium-Proben mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Nachfolgend sollte die mögliche Anwendung der Polymerasekettenreaktion auf klinische Proben geprüft werden. Hierzu wurden nicht transplantierfähige, kontaminierte Kornea-transplantate in ihrem Aufbewahrungsmedium herangezogen. Aus den Aufbewahrungsmedien wurde DNA isoliert und im Anschluss in PCRs eingesetzt.

Zunächst wurde aus 2 klinischen Proben mithilfe des in Kapitel 2.2.8.1 erläuterten Protokolls DNA isoliert. Die gewonnene DNA wurde dann in einer ITS-PCR mit dem Primerpaar ITS1+ITS4 eingesetzt (Abb. 18). Die Detektion von Pilz-DNA in beiden klinischen Proben mittels PCR gelang. Der Vergleich der technischen Duplikate zeigte nur geringfügige Unterschiede.

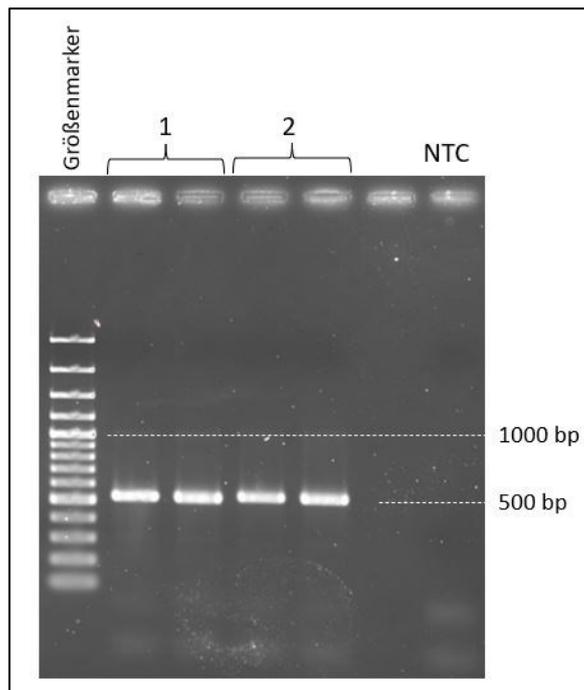


Abb. 18: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten nach PCR mit Primerpaar ITS1 + ITS4 und DNA-Proben isoliert aus zwei klinischen Proben (1 und 2) von kontaminierten Kornealagerungsmedien. Je zwei technische Replikate pro Probe.
NTC: non-template-control

Die oben durchgeführte ITS-PCR allein ermöglicht keine Speziesidentifizierung, sondern lediglich eine Aussage darüber, ob eine Pilzkontamination in der Probe vorliegt. Im

nächsten Schritt wurde daher die Spezies-spezifische PCR (s.o., Kapitel 3.4.1, Abb. 17) zum Nachweis *C. albicans*-spezifischer Virulenzgene auf die klinischen Proben 1 und 2 übertragen.

Das Ergebnis der PCR (Abb. 19) mit DNA aus den beiden obigen klinischen Proben und unter Verwendung der 4 verschiedenen *C. albicans*-spezifischen Primerpaaren (*RBT4*, *RIM8*, *GNA1* und *MNT1*) wies eindeutig darauf hin, dass Probe 2 *C. albicans*-DNA enthält. Für beide Replikate entstanden in allen PCR-Reaktionen *C. albicans*-spezifische Amplifikate der zu erwartenden Fragmentlängen. Die PCR-Reaktionen mit DNA der Probe 1 wiesen keine *C. albicans*-DNA auf, es zeigten sich lediglich schwache unspezifische Banden, die auf DNA-Fragmente unterschiedlichster Größe hinweisen.

Der hier gewählte PCR-Ansatz ist somit in der Lage das Vorhandensein von *C. albicans*-DNA in Kornealagerungsmedium nachzuweisen.

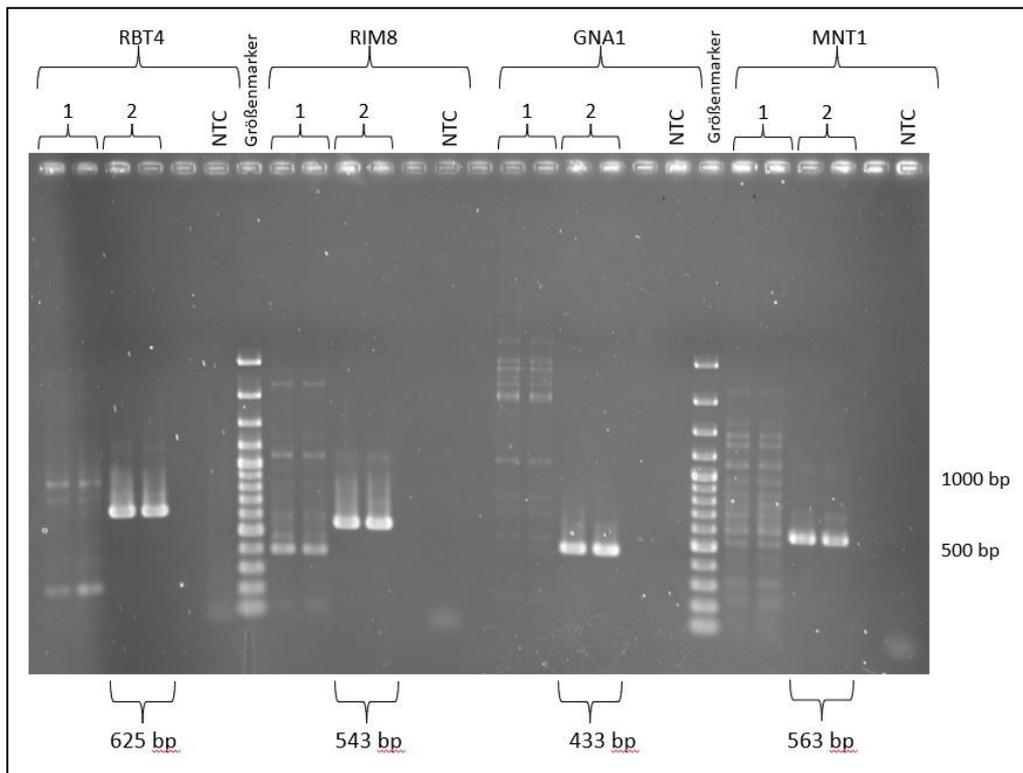


Abb. 19: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten bei Verwendung von DNA-Proben isoliert aus zwei klinischen Proben (1 und 2) von kontaminierten Kornealagerungsmedien und *C. albicans*-spezifischen Primerpaaren zur Amplifikation von *RBT4*, *RIM8*, *BGL2*, *MNT1*, und *GNA1*. Jeweils zwei technische Replikate pro Probe. *NTC*: non-template-control.

Nachdem die Anwendung der gewählten PCR-Assays exemplarisch an zwei klinischen Proben getestet wurde, erfolgte abschließend die breitere Testung an insgesamt 16 klinischen Proben. Probe 6 entspricht dabei Probe 1 in den obigen Versuchen und Probe 16 Probe 2. Somit wurden zusätzlich 14 weitere Proben auf das Vorhandensein von Pilz-DNA überprüft. Die DNA wurde aus Kornealagerungsmedium kontaminierter Transplantate isoliert und mittels PCR die Regionen ITS1 und ITS2 amplifiziert. In allen Proben außer Probe 8 konnten Pilzkontaminationen nachgewiesen werden (Abb. 20). Die Agarosegelelektrophorese zeigte, dass die Fragmente nicht genau gleich lang sind, daher handelte es sich um verschiedene Pilzspezies.

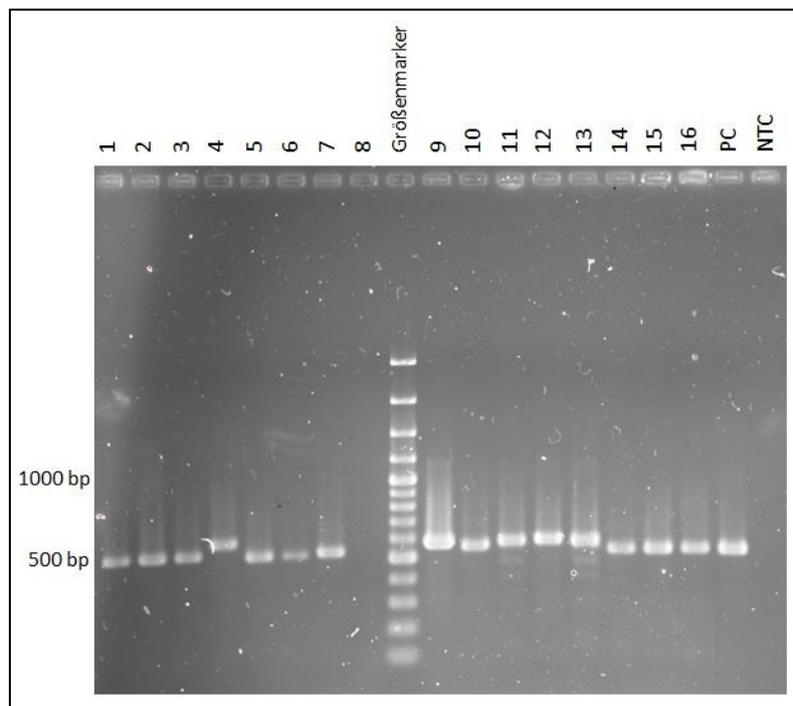


Abb. 20: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten nach PCR mit Primerpaar ITS1 + ITS4 sowie DNA isoliert aus 16 klinischen Proben (Kornealagerungsmedien verworfener Transplantate).

PC: Positivkontrolle, NTC: Non-Template-control.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der PCR-basierte Nachweis von Pilz-DNA in kontaminierten Kornealagerungsmedien aus einer Hornhautbank gelingt. Das Detektionslimit der Methode liegt bei <10 KBE/ml. Ein spezifischer Nachweis von *C. albicans* als eine der häufigsten humanpathogenen Pilzspezies war ebenfalls möglich.

3.4.3 Nachweis von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)

In der Praxis klinischer Labore sind konventionelle Endpunkt-PCRs nicht sehr verbreitet. Als geeigneter erweisen sich sogenannte quantitative PCR- bzw. real-time PCR-Methoden. In dieser Arbeit wurde deshalb auch versucht, den oben beschriebenen PCR-Ansatz zu Amplifikation der ITS1- und ITS2-Region für die Verwendung eines DNA interkalierenden Farbstoffs (SYBR® Green) anzupassen (vgl. Kapitel 2.2.8.4). Es wurde DNA verwendet, welche zuvor aus mit verschiedenen *C. albicans*-Keimzahlen versetztem Kornealagerungsmedium isoliert wurde.

Die Überführung der oben beschriebenen Endpunkt-PCR in eine qPCR gelang (vgl. auch Abb. 24, Anhang (S. 105): Exemplarische Darstellung von Amplifizierungskurven einer qPCR). Die Ct-Werte (Tab. 23) zeigten, dass die eingesetzte *C. albicans*-DNA durch die qPCR-Methode amplifiziert wurde und sich die Methode somit zum Nachweis von *C. albicans* in Kornealagerungsmedium eignet.

Tab. 23: Ct-Werte (Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD)) bei qPCR mit den Primern ITS1 und ITS4 und DNA isoliert aus mit unterschiedlichen Konzentrationen *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium. 3 Versuchsdurchläufe mit je 2 (Experiment 1) bzw. 3 technischen Replikaten (Experiment 2 und 3).

KBE/ml	Ct-Wert Experiment 1		Ct-Wert Experiment 2		Ct-Wert Experiment 3	
	M (n=2)	SD	M (n=3)	SD	M (n=3)	SD
10 ⁶	23,76	0,21	24,61	1,03	23,68	0,59
10 ⁴	33,19	0,01	31,8	0,53	32,56	0,26
10 ³	36,15	0,40	35,53	0,28	36,79	0,27
10 ²	39,68	0,45	38,06	0,49	38,38	0,34
10	40	0	38,72	0,15	39,20	0,74
NTC	40	0	40	0	40	0

Die unterschiedlich hohen Keimbelastungen in den verwendeten Proben (10⁶-10 KBE/ml) führten zu unterschiedlichen Ct-Werten. Hohe Keimbelastungen führten (über eine größere Menge isolierter DNA) zu einer früheren Detektion in der qPCR, also einem

niedrigeren Ct-Wert, während niedrigere Keimbelastungen sich in einem höheren Ct-Wert widerspiegeln.

In allen Proben mit einer Keimlast von 10^2 KBE/ml und höher konnte zuverlässig *C. albicans*-DNA nachgewiesen werden, bei einer Keimlast von 10 KBE/ml gelang dies nur in zwei von drei Versuchsdurchläufen. Die Detektionsgrenze der Methode lag somit im Bereich von 10 bis 10^2 KBE/ml.

Die bei allen qPCR-Reaktionen als Kontrolle mitgeführten Standardreihen konnten stets erfolgreich mitamplifiziert werden. An ihnen konnte ebenfalls die Abhängigkeit des Ct-Wertes von der Menge eingesetzter DNA nachvollzogen werden: Die Standardreihen zeigten einen linearen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge und dem Ct-Wert (vgl. Abb. 5, S. 45).

3.4.4 Nachweis von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium durch „Next-Generation-Sequencing“ (NGS)

Die vorangehend beschriebenen Nukleinsäureamplifikationstechniken ermöglichen eine Detektion von Erregern basierend auf deren Erbinformation. Bei Verwendung spezifischer Primer ist, wie oben erfolgt, auch eine Bestimmung der Spezies möglich. Klinische Proben können eine Vielzahl an möglichen Erregern enthalten. Zum Nachweis dieser Erreger mit Nukleinsäureamplifikationstechniken wäre es notwendig, relevante Pathogene im Vorfeld zu kennen, um Multiplex-PCRs oder viele einzelne PCR-Reaktionen mit keimspezifischen Zielgenen durchführen zu können.

Alternativ kann man zur Speziesbestimmung auch die Sequenzierung eines oder mehrere Zielgene oder eine Untersuchung des Metagenoms durchführen. Durch den Abgleich der ermittelten Sequenzen mit Referenzsequenzen kann man ein großes Erregerspektrum detektieren. Sequenzierungen können somit auch bei der Untersuchung mikrobiologischer Kontaminationen von Korneatransplantaten interessant sein.

Zur NGS-Analyse von Kontaminationen wurde Kornealagerungsmedium mit *C. auris* und *C. albicans* versetzt (jeweils 10^2 , 10^3 und 10^6 KBE/ml) und im Anschluss DNA isoliert. Aus

dieser DNA wurden zunächst die ITS Regionen 1 und 2 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mithilfe des elektronischen Tapestation-Elektrophorese-Systems sichtbar gemacht (Abb. 21).

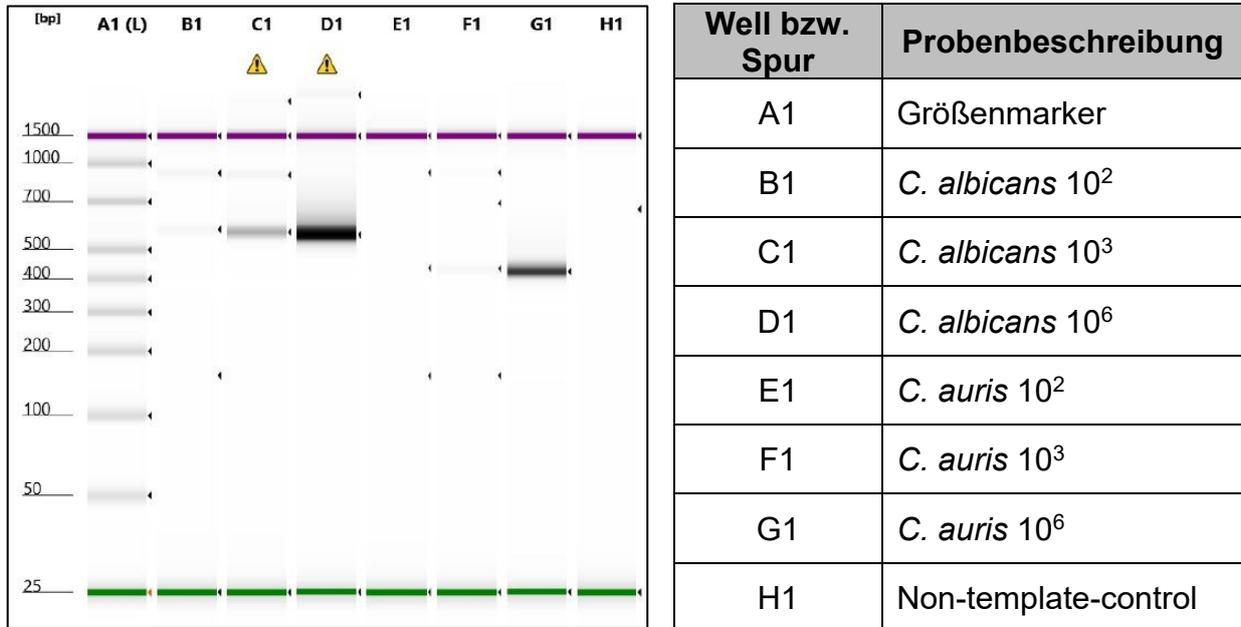


Abb. 21: Virtuelles Elektrophoresebild mit nebenstehender Legende der PCR-Produkte der ITS-PCR mit den Primern ITS1 und ITS4 und DNA isoliert aus mit *C. auris* und *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium (jeweils 10², 10³ und 10⁶ KBE/ml). Die Messung erfolgte mit dem Tapestation-Elektrophorese-System.
NTC: non-template-control

Das virtuelle Elektrophoresebild zeigt einen Größenmarker (A1), die PCR-Produkte mit *C. albicans*-DNA (B1-D1) bzw. *C. auris*-DNA (E1-G1) und das Produkt der PCR-Kontrollreaktion ohne DNA (H1). Sowohl für *C. albicans*-DNA als auch *C. auris* DNA konnten die erwarteten Fragmente von 536 bp bzw. ca. 400 bp Länge nachgewiesen werden. Die Sensitivität der PCR war jedoch im Vergleich zur oben dargestellten ITS-PCR (vgl. Abb. 16) deutlich reduziert. Bei *C. albicans* zeigten nur die Proben mit 10⁶ bzw. 10³ KBE/ml deutliche Banden, bei *C. auris* lediglich die Probe mit 10⁶ KBE/ml. Aus Zeitgründen wurde darauf verzichtet, die Sensitivität weiter zu optimieren.

Für die nachfolgende Sequenzierung wurde nur das Produkt der *C. albicans* DNA, 10³ KBE/ml verwendet (vgl. Abb. 21, C1). Die Probe wurde mithilfe der im Methodenteil

genannten Protokolle bearbeitet und auf einer Oxford Nanopore Technologies Flongle-Flow cell sequenziert. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit der Referenzsequenz (*C. albicans* ITS) abgeglichen. Nach Anwendung eines Qualitätsfilters ergaben sich insgesamt 22080 Sequenzen, von denen 20644 mit der Referenzsequenz übereinstimmten. 1436 Sequenzen konnten nicht der Referenzsequenz zugeordnet werden. Ein Abgleich mit einer *C. auris* ITS-Referenzsequenz ergab keine übereinstimmenden Sequenzen.

Eine Speziesidentifikation von Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium durch das sogenannte target amplicon sequencing der internal transcribed spacer Regionen 1+2 unter Verwendung der Nanoporen Sequenzierungstechnologie ist somit möglich. Die Sequenzierung ist damit eine geeignete Möglichkeit, die durch PCR detektierten Kontaminationen von Kornealagerungsmedien genauer zu identifizieren.

4 Diskussion

Die steigende Anzahl von Pilzinfektionen nach Korneatransplantationen ist ein ernstzunehmendes Problem (Aldave et al., 2013; Edelstein et al., 2016; Thareja et al., 2019). Auch wenn die allermeisten dieser Eingriffe weiterhin komplikationslos verlaufen, sollten die Ursachen für den Trend schnell ermittelt und bekämpft werden. Postoperative Pilzinfektionen bedeuten für die Patienten langwierige Behandlungen mit Antimykotika, verbunden mit deren Nebenwirkungen, häufig erneute operative Eingriffe sowie durchschnittlich schlechtere Visus-Ergebnisse (Chen et al., 2015; Kloess et al., 1993; Merchant et al., 2001; Sutphin et al., 2002; Vislisel et al., 2017).

Bei der bisherigen Suche nach den Gründen für die ansteigende Inzidenz konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Assoziation zwischen dem vermehrten Einsatz von endothelialen Transplantationsverfahren und dem Auftreten von postoperativen Pilzinfektionen besteht (Aldave et al., 2013). Eine Vielzahl an Fallberichten zu dieser Thematik unterstreicht die Schwere dieser Infektionen und die Komplexität der Therapie, welche auch aus der ungewöhnlichen Lokalisation der Infektionsherde an der künstlichen Grenzfläche zwischen empfängereigenen Korneaschichten und dem Transplantat resultiert (Kitzmann et al., 2009; Koenig et al., 2009; Ortiz-Gomariz et al., 2011; Villarrubia und Cano-Ortiz, 2014; Yamazoe et al., 2011). Grund für das häufigere Auftreten von Pilzinfektionen nach solchen Eingriffen könnte die für lamelläre Verfahren nötige Prozessierung des Gewebes sein und damit verbunden wiederholte Aufwärmepisoden der Spenderkornea (Brothers et al., 2017).

Außerdem diskutiert werden Auswirkungen der Kornealagermethode auf die Häufigkeit von postoperativen Pilzinfektionen. Lau et al. (2019) konnten in einer Studie mit Daten aus einer Befragung in Zusammenarbeit mit der European Eye Bank Association zeigen, dass hypotherm gelagerte Korneae häufiger zu postoperativen Pilzendophthalmitiden führen als Transplantate aus Organkulturen. Die Autoren vermuten, dass das Fehlen von Antimykotika in den meisten hypothermen Lagermedien das Auftreten von Pilzinfektionen im Empfänger begünstigen kann. Darüber hinaus könnte auch die erleichterte Detektion von Kontaminanten in Organkultur eine Rolle spielen.

Auf Basis dieser Überlegungen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich der Zusatz des Antimykotikums Amphotericin B unter verschiedenen Lagerungsbedingungen auf die Reduktion von potenziellen Pilzkontaminanten in Medium auswirkt. Darüber

hinaus wurden auch verschiedene Detektionsmethoden und der Einfluss der Lagerbedingungen selbst auf die Detektion untersucht.

4.1 Zusatz von Antimykotika in Kornealagerungsmedien

4.1.1 Bioburdenreduktion bei Zusatz von 2,5 µg/ml Amphotericin B zu Kornealagerungsmedien in hypothermer Lagerung und Organkultur

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Ausgangskonzentration von 2,5 µg/ml Amphotericin B gewählt und die Effekte unter verschiedenen Lagerbedingungen beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl unter hypothermen Bedingungen als auch unter Organkulturbedingungen die Pilzkeimzahl in kontaminiertem Kornealagerungsmedium über die Zeit verringert. Bei initialem Inokulum zwischen 10^2 und 10^4 KBE/ml sank die Pilzkonzentration abhängig von Lagermethode und Inokulum nach 2h bis 5 Tagen unter die Detektionsgrenze des Assays. Im Gegensatz dazu blieb die Pilzkonzentration in Medium ohne Amphotericin B bei 4 °C-Lagerung über 10 Tage stabil bzw. stieg bei 37 °C-Lagerung deutlich an.

Bei Vergleich der zwei Lagerbedingungen hypotherme Lagerung und Organkultur war zu erkennen, dass die Bioburdenreduktion bei höherer Temperatur (Organkultur) etwas rascher erfolgt. Bei sehr hohem initialen Inokulum (10^6 KBE/ml) gelang jedoch weder in hypothermer Lagerung noch unter Organkulturbedingungen eine Reduktion der Keimzahlen unter das Detektionslimit. Auffällig war dabei, dass die Keimzahl bei 37 °C zwar schnell gesenkt werden konnte ($\text{Log}_{10}\text{Red} > 4$ an Tag 3), nach Tag 3 aber wieder anstieg. Dies kann als Hinweis auf die begrenzte Stabilität von Amphotericin B bei 37 °C interpretiert werden. Es ist bekannt, dass Amphotericin B, welches auch in Zellkulturen verwendet wird, bei 37 °C nicht über eine längere Zeit stabil bleibt. Hersteller geben eine Aktivität für 3 Tage bei Einsatz in 37 °C-Kulturen an, dies passt zu den erhobenen Daten. Seiler et al. (2016) untersuchten die Stabilität von Amphotericin B und anderen Substanzen in Kornealagerungsmedium unter Organkulturbedingungen. Sie beobachteten einen Abfall der Amphotericinkonzentration um 15 % nach 7 Tagen und um insgesamt 40 % nach 28 Tagen (ohne Medienwechsel). Zu beachten ist jedoch, dass in diesen Experimenten keine Pathogene im Lagerungsmedium vorhanden waren und die initiale Amphotericinkonzentration bei 25 µg/ml lag. Wagt man dennoch eine Übertragung auf die hier durchgeführten

Versuche, müsste die Amphotericinkonzentration an Tag 7 immer noch über 2 µg/ml betragen haben, was den erneuten Anstieg der Keimzahlen nach Tag 3 nicht erklärt. Eine andere Erklärung für den beobachteten Wirkverlust ab Tag 3 könnte die hohe, für ein Transplantat nach Povidon-Iod-Dekontamination sehr unwahrscheinliche Keimbelastung von 10^6 KBE/ml sein. Es wäre möglich, dass es dadurch bereits initial zu einem „Verbrauch“ des eingesetzten Amphotericin Bs gekommen ist.

Unabhängig vom tatsächlichen Grund des Wirkverlusts ist festzuhalten, dass regelmäßige Medienwechsel während der Dauer der Lagerung sinnvoll sind, sofern man die antimykotische Wirkung aufrechterhalten will. In Anbetracht dessen, dass Kontaminationen auch noch während der Lagerung und Präparation des Gewebes auftreten können, erscheint dies notwendig.

Im Rahmen des Kontaminationsversuches wurde an Tag 5 auch die mikrobiologische Testung mittels Kulturautomaten (Bac/Talert, biomérieux) simuliert. Die Daten zeigen, dass an Tag 5 noch in allen hypotherm gelagerten Proben Pilze mittels Kulturautomat detektierbar waren, unabhängig davon, ob das Medium Amphotericin B enthielt oder nicht. Bringt man dieses Ergebnis in Zusammenhang mit den oben geschilderten Keimzahlbestimmungen, muss man den Eindruck korrigieren, dass das amphotericinhaltige Medium zu einer Keimelimination binnen 5 Tagen geführt hat. Die unterschiedlichen Detektionszeiten von amphotericinhaltigen und amphotericinfreien Proben im Kulturautomaten deuten darauf hin, dass die Keimzahlen durch das amphotericinhaltige Medium zwar reduziert wurden, es jedoch bei keinem Inokulum zu einer vollständigen Elimination bis zum fünften Tag kam.

Unter Organkulturlagerung blieben alle aeroben Kulturflaschen bis auf die mit Proben mit einem initialen Inokulum von 10^6 KBE/ml negativ. Dies ist gut mit den Ergebnissen der Keimzahlbestimmung an Tag 5 in Einklang zu bringen. Bei einer Lagerung bei 37°C und einer initialen Amphotericinkonzentration von 2,5 µg/ml konnten demnach alle Pilze in Proben mit initial $10 - 10^4$ KBE/ml innerhalb der ersten fünf Tage eliminiert werden. Die Detektionsgrenze dieser Untersuchung wurde nicht einzeln ermittelt, betrug aber aller Wahrscheinlichkeit weniger als 10 KBE/ml, da diese Konzentration in den Experimenten (Abb. 9 A, sowie Abb. 14) noch detektiert werden konnte.

Als erstes Fazit ist damit festzuhalten, dass der Zusatz von 2,5 µg/ml Amphotericin B zu Kornealagerungsmedium sowohl in hypothermer Lagerung als auch in Organkultur die Keimbelastung mit *C. albicans* senkt. Die Keimzahlreduktion ist dabei unter Organkulturbedingungen schneller und stärker. Hier ist jedoch die begrenzte Stabilität von Amphotericin B zu beachten und ggf. regelmäßig das Medium zu wechseln.

4.1.2 Bioburdenreduktion bei Verwendung abweichender Amphotericin B-Konzentrationen

4.1.2.1 Verschiedene Amphotericinkonzentrationen in hypothermer Lagerung

Durch Modifikation des Versuchsaufbaus konnte gezeigt werden, dass die Bioburdenreduktion auch von der gewählten Amphotericinkonzentration abhängig ist. Verwendet man niedrige Konzentrationen, getestet wurden 1,25 und 0,25 µg/ml, so fällt die Reduktion der Pilzkonzentration unter hypothermen Bedingungen geringer aus als bei Verwendung von 2,5 µg/ml. Eine Keimelimination kann damit nicht zeitnah herbeigeführt werden. Die Verwendung dieser Konzentrationen kann somit nicht empfohlen werden.

Zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass die Keimzahlentwicklungen bei diesem Versuch (vgl. Abb. 10 D) mit 2,5 µg/ml Amphotericin B nicht ganz identisch waren mit den oben geschilderten Daten (Abb. 8 B). Obwohl auch dort 2,5 µg/ml Amphotericin B verwendet wurden, schien die Bioburdenreduktion in diesem Versuch noch weniger effektiv zu verlaufen. Beide Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Es wurde derselbe *C. albicans*-Stamm verwendet.

Im Kontrast zu unseren Daten stehen die Ergebnisse verschiedener Studien, deren Autoren eine Zugabe von 0,25 µg/ml Amphotericin B zu hypothermen Lagermedien für ausreichend halten: Duncan et al. (2016) untersuchten in einer dieser Arbeit ähnlichen Weise die Wirksamkeit von Amphotericin B auf die Reduktion von *Candida albicans* in hypothermen Kornealagerungsmedium. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass eine Konzentration von 0,255 µg/ml Amphotericin B ausreicht, um Kontaminationen innerhalb von 48h zu eliminieren. Dies ist besonders beachtenswert, da durch das gewählte Kontaminationsinokulum $2,5 \times 10^6$ KBE/ml eine sehr hohe Keimbelastung simuliert wurde. Weil in

dieser Studie der gleiche *C. albicans*-Stamm (ATCC 10231) wie in dieser Arbeit verwendet wurde, scheidet unterschiedliches Wachstums-/ Resistenzverhalten des Pilzes als Grund für die abweichenden Ergebnisse aus. Lediglich das Kornealagerungsmedium kommt evtl. als Grund in Frage: In der Studie von Duncan et al. kam das kommerzielle „Optisol-GS“ zum Einsatz, während in dieser Arbeit selbst hergestelltes Medium verwendet wurde.

Schon zuvor kamen Layer et al. (2014) in ihrer Studie „Efficacy and Safety of Antifungal Additives in Optisol-GS Corneal Storage Medium“ zu ähnlichen Ergebnissen wie Duncan et al. (2016). Sie testeten insgesamt 4 Konzentrationen von Amphotericin B und beobachteten unabhängig von der Amphotericinkonzentration bei Kontamination mit $2,5 \times 10^3$ KBE/ml *C. albicans* eine vollständige Elimination an Tag 2, sogar schon bei einer Konzentration von nur 0,0625 µg/ml Amphotericin B. Hier kam jedoch ein *anderer C. albicans*-Stamm zum Einsatz (ATCC 90028).

Auch Tran et al. (2019) verwendeten in ihrer Studie „Optisol-GS“. Sie stellten fest, dass ein Zusatz von 0,255 µg/ml Amphotericin B zu Kornealagerungsmedium *C. albicans* nicht innerhalb von 48 h eliminieren konnte. In allen kontaminierten Proben waren nach 48 h noch Pilze detektierbar. Dies steht in Einklang mit unseren Daten und im Kontrast zu den Studien von Duncan et al. und Layer et al. Jedoch kontaminierten Tran et al. nicht das Optisol-Medium direkt mit Pilzen, sondern Korneoskleralgewebe und brachten das kontaminierte Gewebe erst dann in das Lagermedium. Dies ist ein realistischeres Szenario als die direkte Kontamination des Mediums. Auch die mikrobiologische Detektionsweise der Kontamination war in dieser Studie umfangreicher. Zudem wurden klinische *C. albicans*-Isolate verwendet. All diese Unterschiede im Versuchsdesign können die abweichenden Ergebnisse erklären.

Erwähnt werden sollen an dieser Stelle auch zwei aktuelle Studien: Tran et al. (2020) untersuchten wie die hier vorliegende Arbeit verschiedene Konzentrationen von Amphotericin B in hypothermem Kornealagerungsmedium auf die Bioburdenreduktion von *C. albicans*. Äquivalent zu den Experimenten in dieser Arbeit, führten die Autoren Versuche mit dem Stamm ATCC 10231 durch und beobachteten die Bioburdenreduktion in Abhängigkeit von Amphotericinkonzentration und Zeit. Anders als in dieser Arbeit verwendeten sie nur eine Pilzkonzentration (initial 10^5 KBE/ml) und verfolgten die Keimzahlentwicklung lediglich für 72 h.

Ungewöhnlich und abweichend von unseren Daten stellten die Autoren in den Kontrollproben ohne Amphotericin B einen Anstieg der Keimzahl um 1 log₁₀-Stufe nach 72 h fest. Ein Wachstum der Pilze unter diesen Bedingungen (2-8 °C) ist eigentlich nicht zu erwarten und trat in unseren Experimenten auch nicht auf (vgl. Abb. 8 A und 10 A). Zur Bestimmung der Effektivität von Amphotericin B wurde in der Studie von Tran et al. die Log₁₀-Reduktion bestimmt. Dies ist ein übliches Vorgehen, welches nach DIN ISO u.a. auch zur Qualitätskontrolle von Sterilisierungsmethoden eingesetzt wird und ein Maß dafür ist, wie stark die Keimlast einer Probe durch eine Maßnahme reduziert wurde (Deutsches Institut für Normung e.V., 2021). In diesem Fall wurde die Keimzahl in den Proben mit Amphotericin B in Relation gesetzt zu den Negativkontrollen (Proben ohne Amphotericin B). Es ergeben sich dadurch Log₁₀-Reduktions-Werte, die aufgrund des Vergleichsverhältnisses nicht zwingend eine Reduktion der Keimzahl durch die Amphotericinwirkung widerspiegeln müssen, sondern in Teilen auch durch einen Anstieg der Pilzkonzentrationen in der Kontrolle begründet sein können. Da die tatsächlich gemessenen Keimzahlen in der Studie nicht dargestellt sind, ist ein Vergleich mit den Daten dieser Arbeit schwierig. Diese Überlegung kann aber eine Erklärung dafür sein, weshalb die von Tran et al. ermittelten Log₁₀-Reduktionswerte höher liegen als die in dieser Arbeit erhobenen Daten. So wird in der betreffenden Studie von einer log₁₀-Reduktion von 1,16 nach 72 h bei einer Amphotericinkonzentration von 0,25 µg/ml gesprochen, während nach diesem Zeitraum in unseren Proben bei gleicher Konzentration und vergleichbarem Inokulum (10⁴ KBE/ml) noch fast kein Effekt sichtbar war. Bei Konzentrationen von 1,25 bzw. 2,5 µg/ml Amphotericin B ermittelten die Autoren log₁₀-Reduktionen von über 3, während eine solche Reduktion in unseren Experimenten selbst nach 10 Tagen in hypothermer Lagerung nicht erreicht wurde.

Erwähnenswert ist bei der Studie von Tran et al. auch, dass die Proben zur Keimzahlbestimmung nicht direkt auf Nährbodenplatten aufgebracht wurden, sondern zunächst mit RESEP behandelt wurde. Bei RESEP handelt es sich um ein harzhaltiges System, welches antimikrobielle Rückstände in Proben reduziert (Mistò et al., 2017). In den anderen oben erwähnten Studien und auch in dieser Arbeit wurde keine RESEP und auch kein vergleichbares System verwendet. Auch wenn eine Wirksamkeit und Berechtigung des Einsatzes von RESEP zur Detektion von Kontaminationen in Kornealagerungsmedium an anderer Stelle nachgewiesen wurde (Mistò et al., 2017; Skenderi et al., 2018; Vignola et

al., 2019), ist nicht davon auszugehen, dass Amphotericinrückstände in den ausplattierten Proben in dieser Arbeit die gemessenen Keimzahlen beeinflusst haben. Wäre dies der Fall gewesen, hätte man schon bei Vergleich der Keimzahlen zum Zeitpunkt t_0 in amphotericinhaltigem und amphotericinfreiem Medium einen Unterschied feststellen müssen. Dies war aber nicht der Fall (vgl. Abb. 8 und 10). Zudem kam in der Regel noch ein Verdünnungseffekt hinzu, da die Proben vor dem Ausplattieren verdünnt wurden, um eine auszählbare Zahl an Kolonien zu erhalten. Tran et al. kamen in ihrer abschließenden Bewertung zum Schluss, dass $0,25 \mu\text{g/ml}$ Amphotericin B unter hypothermen Lagerbedingungen nicht zu empfehlen sind. Damit stimmen die Autoren in diesem Punkt trotz aller methodischer Differenzen mit der hier vorliegenden Arbeit überein und konnten die Daten von Layer et al. (2014) und Duncan et al. (2016) nicht bestätigen.

Bereits ein Jahr zuvor erschien die Studie von Giurgola et al. (2019) mit vergleichbarer Methodik. Bei einem Pilzinokulum von 10^5 - 10^6 KBE/ml und einer Amphotericinkonzentration von $2,5 \mu\text{g/ml}$ ergab sich dort mit dem *Candida albicans* ATCC Stamm 10231 eine Log₁₀ Reduktion von 2,5 nach nur einem Tag, welche auf 3,6 nach 7 Tagen stieg. In dieser Arbeit verlief die Bioburdenreduktion vor allem in den ersten Tagen langsamer (vgl. Abb. 8), im Verlauf wurden jedoch auch Log₁₀ Reduktionen von 2,5 an Tag 7 und 3,2 an Tag 10 erreicht. Die Studie verwendete zusätzlich ein niedrigeres Inokulum von 10^3 KBE in 20 ml (entspricht 5×10^1 KBE/ml) und stellte dabei eine vollständige Elimination nach 3 Tagen fest (andere *Candida albicans* Stämme). Bei einem solch niedrigen Inokulum gelangt man jedoch schnell an das Detektionslimit der Untersuchungsmethode. So konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit beim niedrigsten Inokulum mit der Koloniezählmethode auf Agarplatten Pilzwachstum nicht zuverlässig detektiert werden. Jedoch gelang im Kulturautomaten auch nach 5 Tagen hypothermer Lagerung mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Amphotericin B noch der Pilznachweis.

Die beiden Studien Tran et al. (2020) und Giurgola et al. (2019) verwendeten im Gegensatz zu den anderen hier genannten Studien nicht „Optisol-GS“, sondern das Medium „Kerasave“ des Unternehmens AL.CHI.MI.A. srl (Ponte San Nicolò, Italien). Dabei handelt es sich nach Angaben des Unternehmens um das erste kommerziell erhältliche Medium zur hypothermen Lagerung von Korneatransplantaten, welches ein Antimykotikum ($2,5 \mu\text{g/ml}$ Amphotericin B) enthält.

4.1.2.2 Verschiedene Amphotericinkonzentrationen unter Organkulturbedingungen

Das Versetzen von hypothermen Kornealagerungsmedien mit Antimykotika ist, wie oben erläutert, eine momentan vieldiskutierte Thematik. Dies erklärt die Anzahl der in den letzten Jahren dazu publizierten Studien, von denen einige im vorausgegangenen Abschnitt zitiert wurden. Bei Organkulturmedien ist das Hinzugeben von Antimykotika hingegen schon seit der Einführung dieser Lagermethode etabliert. Der Jahresbericht der European Eye Bank Association 2018 bestätigt, dass die Verwendung von Antimykotika in Organkulturmedien in Europa weitverbreitet ist und die Hornhautbanken entweder kommerzielle Medien mit Antimykotika verwenden oder ihrem selbsthergestellten Medium Antimykotika zusetzen (European Eye Bank Association, 2018). Es findet sich jedoch kaum aktuelle Literatur, welche die Effektivität dieser Praxis untersucht. Als Substanz hat sich Amphotericin B durchgesetzt, nur wenige Hornhautbanken verwenden andere Antimykotika, in der Regel andere Polyene wie Nystatin. Darüber hinaus herrscht über die erforderliche Konzentration kein Konsens, in der Literatur finden sich Angaben zwischen 0,25 und 25 µg/ml Amphotericin B (Armitage et al., 2014; Armitage und Easty, 1997; Fontana et al., 2007; Haug et al., 2013; Hermel et al., 2010; Ling et al., 2019; Röck et al., 2017; Seiler et al., 2016; Thuret et al., 2002).

In unseren Experimenten zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Amphotericinkonzentrationen. Der Einsatz von 2,5 µg/ml oder 1,25 µg/ml Amphotericin B in Organkulturmedium konnte die Pilzkeimzahl innerhalb der ersten 3 Tage unter die Detektionsgrenze senken. Eine Konzentration von 0,25 µg/ml erwies sich hingegen als nicht ausreichend und konnte das Pilzwachstum nur vorübergehend einschränken (vgl. Abb. 11 und 12). Ein entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit ist deshalb, dass ein Versetzen von Organkulturmedium mit einer Konzentration von 0,25 µg/ml Amphotericin B nicht genügend ist. Diese Erkenntnis muss durch weitere Studien überprüft werden. Sollte sie sich bestätigen, so müssten Hornhautbanken, die diese Konzentration verwenden, zeitnah ihre Medienzusammensetzung optimieren. Aufgrund der weitverbreiteten Anwendung ihrer Medien sollten insbesondere die Hersteller von kommerziell erhältlichen Kornea-Organokulturmedien, welche ihren Medien diese niedrige Amphotericinkonzentration zusetzen, handeln.

Zur Fragestellung der Amphotericinkonzentration ist insgesamt festzuhalten, dass Konzentrationen von 0,25 und 1,25 µg/ml weniger effektiv in der Keimzahlreduktion sind als eine Konzentration von 2,5 µg/ml. Zum Einsatz unter hypothermen Bedingungen sind sie auf Basis der hier erhobenen Daten nicht zu empfehlen, wobei die Studienlage dazu nicht einheitlich ist. Unter Organkulturbedingungen zeigten sich 1,25 µg/ml ähnlich wirksam wie 2,5 µg/ml, eine Konzentration von 0,25 µg/ml reichte hingegen nicht aus. Die in der Literatur beschriebene Amphotericinkonzentration von 0,25 µg/ml in Organkulturmedien kann auf Grundlage der hier ermittelten Daten nicht unterstützt werden.

4.2 Auswirkungen von Antimykotika in Kornealagerungsmedium auf die Detektion in Kulturautomaten

Neben der Bioburdenreduktion durch Amphotericin B in Kornealagerungsmedium wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von Amphotericin B auf die Sterilitätstestung von Kornealagerungsmedium in Kulturautomaten getestet.

Kulturautomaten kommen vor allem zur Sterilitätstestung von Blut zum Einsatz. Sie eignen sich jedoch auch zur mikrobiologischen Testung anderer (Körper-)Flüssigkeiten und zeichnen sich durch einfache Handhabung und geringe Gefahr einer ungewollten Probenkontamination aus. Verschiedene Studien zeigten, dass Kulturautomatensysteme auch zur Sterilitätstestung von Kornealagerungsmedium geeignet sind und eine schnellere Detektion bei gleicher oder höherer Sensitivität aufweisen als konventionelle Verfahren (Gain et al., 2001; Thuret et al., 2002; Thuret et al., 2005).

Die Fragestellung in dieser Arbeit ist, ob Reste des Antimykotikums im Kornealagermedium die Detektion von Pilzen in den Kulturflaschen stören. Solche Störeffekte könnten sich zum Beispiel als verlängerte Detektionszeiten oder falsch-negative Kulturergebnisse zeigen. Die Gegenwart von antimikrobiellen Substanzen ist ein bekanntes Problem bei kulturellen Testverfahren. Die Hersteller von Kulturautomatensystemen versuchen dies durch die fortwährende Weiterentwicklung ihrer Kulturflaschen und den Zusatz von Aktivkohle oder adsorbierenden Kunstharzen zu verringern.

In dem zu dieser Fragestellung durchgeführten Experiment konnten keine signifikanten Störeffekte bei der Detektion beobachtet werden. Eine Erklärung dafür kann die Verdünnung der Probe durch das Kulturmedium in den Kulturflaschen sein, welche zu einer

niedrigeren Amphotericinkonzentration führte. Darüber hinaus enthalten die Bactalert FA Plus- und FN Plus-Flaschen adsorbierende Polymerperlen, welche laut Hersteller antimikrobielle Substanzen, auch Polyenantimykotika wie Amphotericin B, neutralisieren. Beide Effekte zusammen erklären möglicherweise, warum keinerlei Beeinträchtigung der Detektion beobachtet werden konnte. Unter realen Bedingungen kommen ggf. auch noch Verbrauchs- und Instabilitätseffekte des Amphotericin Bs während der Lagerzeit der Kornea bis zur mikrobiologischen Testung hinzu. Insgesamt ist damit unter den genannten Bedingungen keine Interaktion von Amphotericin B mit der Detektionsmethode zu befürchten. Die Detektion gelang zuverlässig, auch bei niedrigen Keimbelastungen von 10 KBE/ml.

Bei einer Validierungsstudie aus dem Jahr 2012 zeigten sich geringfügig verlängerte Detektionszeiten bei der Sterilitätstestung von Kornealagerungsmedium in BACTEC-Kulturflaschen (Schroeter et al., 2012). Die Autoren führten dies auf eine nicht ausreichende Neutralisation der Antimykotika bzw. Antibiotika in den Kulturflaschen zurück. Jedoch gibt es erhebliche methodische Unterschiede zu dem in dieser Arbeit beschriebenen Experiment, unter anderem bei der Auswahl der Kulturflaschen und Korneakulturmediums. Um größere Sicherheit in dieser Fragestellung zu gewinnen, wären Studien mit größerer Probenzahl sowie verschiedenen Erregern und Kulturautomatensystemen notwendig.

Auch wenn in dieser Arbeit keine Hinweise auf eine Inhibition der Detektion durch Antimykotika in den Kulturflaschen selbst beobachtet werden konnten, ist zu beachten, dass antimykotische Zusätze im Kornealagerungsmedium während der Lagerungszeit die Keimbelastung reduzieren können. Dies ist zwar der gewünschte Effekt, kann aber die mikrobiologische Detektion verzögern, da niedrige Keimzahlen zu längeren Detektionszeiten führen.

Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass die Versuche nur mit einem *C. albicans*-Stamm durchgeführt wurden. Es erfolgte jedoch eine Übertragung auf einen Stamm der Spezies *C. auris*. *C. auris* erregte in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit, v.a. durch die Fähigkeit nosokomiale Ausbrüche zu verursachen sowie durch das Auftreten multiresistenter Isolate.

Insgesamt zeigten sich bei Übertragung der Spikingexperimente auf *C. auris* sehr ähnliche Daten wie bei der Versuchsdurchführung mit *C. albicans*. Auffällig ist jedoch, dass die

Detektion in Bac/Talart-Kulturflaschen bei *C. auris* deutlich länger dauerte. Dies sollte vor allem unter dem Gesichtspunkt von *Negative-To-Date*-Freigaben betrachtet werden: In Deutschland sieht die Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank vor, dass Hornhäute auch schon vor Vorliegen eines abschließenden Ergebnisses der mikrobiologischen Testung zur Transplantation freigegeben werden dürfen (Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 2018). Dies kann im Einzelfall entscheidende Vorteile bieten (kürzere Lagerdauer des Transplantates, Verfügbarkeit bei dringender Indikation, etc.), birgt jedoch immer das Risiko, dass eine Kontamination erst nach der Keratoplastik erkannt wird. Aktuell sieht die Richtlinie eine Freigabe frühestens 48 h nach Anlegen der mikrobiologischen Kultur vor. Bezogen auf die *C. auris*-Versuchsergebnisse bedeutet dies, dass eine Kontamination mit diesem Pathogen eventuell erst nach Transplantation auffallen würde. Die Detektionszeiten für *C. auris* lagen zwischen 19 und 168 h (abhängig von Inokulum und Amphotericinzusatz). Proben mit realitätsnahen Pilzkonzentrationen von 10 KBE/ml bzw. 10^2 KBE/ml wurden erst nach ca. 100 h detektiert, also deutlich später als die in der Richtlinie genannten 48 h. Zwar sind *C. auris*-Übertragungen durch Keratoplastik bisher nicht beschrieben, das schließt ihr Auftreten in der Zukunft jedoch nicht aus. Prinzipiell scheint *C. auris* in der Lage zu sein, ein ähnlich breites Spektrum an Erkrankungen zu verursachen wie *C. albicans*, dem häufigsten Erreger bei Postkeratoplastik-Pilzinfektionen.

Die lange Detektionszeit in Kulturautomatensystemen ist jedoch kein Problem, welches nur *C. auris* betrifft. Mehrere Studien kamen zum Ergebnis, dass die Länge der Detektionszeit in Kulturautomaten von der Pilzspezies abhängig ist. Insbesondere *Candida glabrata* fiel durch ungewöhnlich lange Detektionszeiten auf (Beyda et al., 2018; George et al., 2005). Es gibt sogar Versuche, die Unterschiede in der Detektionszeit diagnostisch auszunutzen (Huang et al., 2013; Lai et al., 2012). Natürlich hängt die Detektionszeit nicht nur von der Art, sondern auch vom verwendeten Kulturautomatensystem, dem Flaschentyp, der Art und Keimbelastung der Probe sowie ggf. vom Vorhandensein antimykotischer Substanzen ab. Dennoch legen unsere Daten nahe, dass die *Negative-to-date*-Freigabeoption eventuell neu evaluiert werden sollte, da sich in unseren Versuchen Detektionszeiten nah an bzw. über 48 h (vgl. Abb. 9 A und 13) zeigten und Pilzspezies mit noch längeren Detektionszeiten existieren. Eine Vorab-Freigabe des Transplantats nach 48 h kann

bei Vorliegen solcher Pilzspezies auf dem Gewebe zu einer erhöhten Gefährdung des Empfängers führen.

Aus einer anderen Perspektive heraus ließe sich jedoch auch argumentieren, dass unsere Daten eindeutige Vorteile von Organkultur gegenüber hypothermer Lagerung bei der Detektion von Pilzkontaminanten zeigen: Die langen Detektionszeiten traten in unseren Experimenten nur bei Proben aus hypothermer Lagerung auf. Bei Proben aus Organkultur in amphotericinfreiem Medium hatten die Pilze sich in den fünf Tagen bis zur Probenentnahme schon deutlich vermehrt, sodass die Detektion im Automaten schnell erfolgte. Daraus ist ableitbar, dass im Falle eines Versagens der antimykotischen Wirkung, zum Beispiel bei resistenten Spezies oder bei initial sehr hoher Keimbelastung, mit einer raschen Detektion der Kontaminanten zu rechnen ist. Die Lagerung bei 37°C bringt also nicht nur den Vorteil einer effektiveren und schnelleren Wirkung von Antimykotika mit sich, sondern zudem Vorteile bei der raschen und sicheren Detektion von Kontaminanten. Hypotherme Lagerung hingegen führt zu langsamer Detektion von Pilzkontaminanten in kulturellen Verfahren. Die Verwendung antimykotikahaltiger Medien in hypothermer Lagerung verstärkt dieses Problem noch (vgl. Abb. 9 A) und sollte unter Berücksichtigung ihrer begrenzten Effektivität (s. oben) gründlich abgewogen werden. Ein Verzicht auf Antimykotika in Organkultur wäre denkbar, denn die schnelle und sichere Detektion von Kontaminanten im Kulturautomaten würde die Empfängersicherheit gewährleisten. Jedoch würde dieses Vorgehen sehr wahrscheinlich zu einer hohen Anzahl von Transplantaten mit positivem Kulturergebnis führen, welche dann nicht zur Transplantation verwendet werden dürften. Dies würde wiederum die Transplantatknappheit weiter verschärfen und die Wartezeiten auf ein Transplantat für Patienten erhöhen. Damit ist der Einsatz von antimykotikahaltigem Medium und Organkultur in Anbetracht der hier vorliegenden Daten als bestmögliche Lageroption zu betrachten.

4.2.1 Bedeutung anaerober Kulturflaschen bei der Detektion von Kontaminanten in Kornealagerungsmedium

In den in dieser Arbeit dargestellten BacTAlert-Versuchen wurden größtenteils nur Ergebnisse aerober Kulturflaschen (BACT/ALERT iFA Plus, bioMérieux) besprochen, da C.

albicans als aerober Pilz in diesen Flaschen erwartungsgemäß zuverlässiger detektiert wurde. Alle Versuche wurden jedoch stets mit einem Flaschenpaar bestehend aus aerober und anaerober Flasche durchgeführt. Dabei zeigten auch einige anaerobe Flaschen positive Ergebnisse. Dies betraf in der Regel Proben mit hoher Keimbelastung. In diesen Fällen gelang in anaeroben Flaschen zum Teil sogar eine schnellere Detektion als in den aeroben Flaschen mit gleichen Proben. Die Ergebnisse der anaeroben Flaschen waren jedoch insgesamt schlechter replizierbar. Begründet sind diese Effekte wahrscheinlich in der Fähigkeit der Pilze, auch unter anaeroben Bedingungen geringfügig Metabolismus zu betreiben. *C. albicans* wurde bereits von verschiedenen Körperregionen mit anaerober Umgebung isoliert, einzelne Studien zeigen, dass der Erreger grundsätzlich auch unter anaeroben Bedingungen wachsen kann (Dumitru et al., 2004; Webster und Odds, 1987). Auch das Wachstum in anaeroben Kulturflaschen trat in anderen Studien auf (Plantamura et al., 2012). Bei den Detektionszeiten kann zusätzlich auch die unterschiedliche Einstellung der Empfindlichkeit der colorimetrischen Messung von Seiten des Herstellers eine Rolle spielen. Da die Detektion in aeroben Flaschen die eigentliche Fragestellung war und gut gelang, wurden die Effekte in anaeroben Flaschen in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Zur Detektion anderer, anaerob wachsender Erreger, ist jedoch stets ein Flaschenpaar aus aerober und anaerober Flasche zur vollständigen mikrobiologischen Untersuchung zu verwenden. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass *Candida glabrata* in Studien durch eine überraschend gute Detektion in anaeroben Flaschen auffiel, welche die oben genannten Probleme bei der Detektion dieser Spezies in Teilen ausgleichen kann (Ericson et al., 2012; George et al., 2005; Thuret et al., 2005).

Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass nur ein Kulturautomatensystem und eine Art Kulturflaschen verwendet wurden. Die BACT/ALERT iFA Plus und iFN Plus Flaschen (bioMérieux) wurden vom Hersteller für diese Anwendung empfohlen. Ein anderer Kulturautomat stand in unseren Laboren nicht zur Verfügung.

4.3 Toxisches Potenzial von antimykotischen Zusätzen in Kornealagerungsmedium

Für die hier vorliegende Arbeit wurden keine Korneae eingesetzt, es wurde ausschließlich Kornealagerungsmedium untersucht. Die Durchführung von Experimenten mit

Korneagewebe, wie es unter anderem Tran et al. (2019) umgesetzt haben, ist ein realitätsnäheres Vorgehen, erfordert jedoch den Zugang zu Kornealgewebe. Hier können sich ggf. ethische Probleme ergeben, denn das Vorhandensein geeigneter Gewebe ist begrenzt. Dennoch sind solche Experimente nötig, um die hier gefundenen Erkenntnisse zu überprüfen. Die Verwendung von Gewebe ermöglicht nicht nur eine Adhäsion bzw. Biofilmbildung der Kontaminanten am Gewebe, sondern ist auch Voraussetzung, um die Toxizität von antimykotischen Zusätzen zu klären. Inwieweit Antimykotika in Lagerungsmedium Korneae schädigen können, wird immer wieder in Frage gestellt. Die EBAA nennt Sicherheitsbedenken als einen Grund, weshalb sie die Zugabe von Antimykotika zu Kornealagerungsmedium aktuell nicht empfiehlt (Aldave et al., 2013). Verschiedene Studien untersuchten in der Vergangenheit vor allem Veränderungen an den Endothelzellen, welche für das Überleben des Transplantates im Empfänger essentiell sind. Der Einsatz von Amphotericin B in „Optisol-GS“ oder als Bestandteil von „Kerasave“ zeigte übereinstimmend in verschiedenen Studien keine nennenswerten toxischen Veränderungen am Gewebe, lediglich bei einer sehr hohen Konzentration von 40 µg/ml konnte eine stärkere Reduktion der Endothelzellichte im Vergleich zu nicht supplementiertem Medium festgestellt werden (Duncan et al., 2016; Giurgola et al., 2019; Layer et al., 2014; Perry et al., 2020; Tran et al., 2020). Auch Voriconazol zeigte keine Endotheltoxizität (Layer et al., 2014; Ritterband et al., 2007). Alle genannten Studien wurden unter hypothermer Lagerung durchgeführt. Keine Studie untersuchte die Toxizität von Antimykotika unter Organkulturbedingungen. Da die Zugabe von Antimykotika zu Organkulturmedium schon lange praktiziert wird, erscheint eine relevante Gewebeschädigung jedoch unwahrscheinlich.

4.4 Die Rolle anderer Antimykotika sowie weiterer Ansätze zur Dekontamination von Korneatransplantaten

Neben Amphotericin B gibt es eine Auswahl weiterer Antimykotika, die ggf. ebenfalls als antimykotische Zusätze in Kornealagerungsmedium geeignet wären. Brothers et al. (2017), Ritterband et al. (2007) und Layer et al. (2014) untersuchten Voriconazol auf seine Anwendbarkeit in Kornealagerungsmedium, in den Studien von Brothers et al., 2017 kam zudem Caspofungin zum Einsatz. Brothers et al. erwogen auch die Möglichkeit, mehrere Antimykotika mit verschiedenen Wirkweisen zu kombinieren. Diese Idee kam bereits auf,

als McCarey-Kaufmann-Medium noch das Standardmedium für die Lagerung von Korneae war: Kowalski et al. erwogen 1985 eine Kombination von Amphotericin B, Natamycin, Nystatin und Clotrimazol in niedrigen Dosierungen. In Anbetracht zunehmender Resistenzentwicklung bei Pilzen gewinnen solche Ansätze wieder an Aktualität. Bei der Entscheidung für andere Antimykotika spielen neben der Wirksamkeit auch Kosten eine Rolle. Amphotericin B ist ein verhältnismäßig günstiges Präparat, während die Kosten für andere Antimykotika deutlich höher ausfallen. Als Entscheidungshilfe können Kosten-Wirksamkeits-Analysen mit Vergleich der verschiedenen Antimykotika-Optionen dienen, wie sie zum Beispiel von Chiang et al., 2020; Gibbons et al., 2020 publiziert wurden. Dennoch sind auch solche Analysen kritisch zu beleuchten, unter anderem weil die dabei verwendeten Konzepte, wie das der „quality-adjusted-life-years“ umstritten sind.

Neben dem Zusatz antimykotischer Substanzen zum Lagerungsmedium gibt es auch andere Ansätze, die Keimbelastung von Korneatranplantaten zu verringern. Salisbury et al. (2019) versuchten beispielsweise die Reinigung der Kornea mit Povidon-Iod-Lösung bei der Entnahme des Gewebes vom Spender zu optimieren. Der Nutzen dieser Vorgehensweise ist jedoch nicht klar (Sahay und Maharana, 2019).

4.5 Die Rolle molekularbiologischer Nachweismethoden in der klinischen Diagnostik

Neben den Lagerbedingungen ist auch eine sensitive mikrobiologische Testung der Transplantate essentiell, um postoperative Pilzinfektionen zu verhindern. Aktuell kommen dabei vor allem Kulturautomatensysteme zum Einsatz. Wie oben beschrieben sind sie einfach in der Durchführung und etabliert für diese Anwendung. Ein wesentlicher Nachteil ist der Zeitaufwand, besonders im Kontext von Negative-to-date-Freigaben, wie bereits in Kapitel 4.2 diskutiert wurde.

Molekularbiologische Detektionsmethoden liefern in aller Regel deutlich schneller Ergebnisse. Sie beruhen nicht auf der Detektion von Pathogenwachstum, sondern erfassen die DNA der Erreger. Prinzipiell ist dadurch eine höhere Sensitivität als bei kulturellen Methoden erreichbar, jedoch hängt dies von Probenzusammensetzung und Methode ab. Ein weiterer Vorteil dieser Testmethoden ist, dass die Analyse der DNA zusätzliche Informationen über den Erreger liefern kann, zum Beispiel über Identität oder Antibiotika- bzw.

Antimykotikaresistenzen. Vorteilhaft ist zudem, dass molekularbiologische Methoden nicht auf Pathogenwachstum angewiesen sind, wodurch antimikrobielle Substanzen in der Regel nicht die Detektion stören.

Trotz der genannten Vorteile gelingt die Integrierung dieser Testmethoden in die Routinediagnostik nur schleppend. Das liegt im Wesentlichen daran, dass viele entwickelte Methoden bisher nicht standardisiert und validiert sind. Zum Teil sind innovative Methoden auch (noch) nicht kostendeckend einsetzbar. Weitere Probleme ergeben sich in der Interpretation der Ergebnisse: Anders als kulturelle Verfahren differenzieren molekularbiologische Methoden nicht zwischen vitalen, vermehrungsfähigen und nicht vermehrungsfähigen Pathogenen. Ein Erregernachweis durch PCR oder ein vergleichbares Verfahren bedeutet also nicht unbedingt eine aktive Infektion mit diesem Erreger. Die oft hohe Sensitivität im Vergleich zur Kultur ist zwar einerseits ein großer Vorteil, kann aber auch zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der Untersuchungsergebnisse führen. Die Differenzierung zwischen Umweltkontamination der Probe, harmlosen Kommensalen bzw. pathogenen Infektionserregern kann Probleme bereiten. Molekularbiologische Methoden liefern auch kein konventionelles Resistogramm. Die Identifizierung des Erregers liefert zwar erste Anhaltspunkte für die Auswahl geeigneter antimikrobieller Substanzklassen und es ist auch möglich, bekannte Resistenzgene mittels PCR zu detektieren oder durch Gesamtgenom-Sequenzierung der Erreger und anschließendem Sequenzabgleich mit einer Resistom-Datenbank bekannte Resistenzen aufzufinden. Diese Vorgehensweise ist bisher allerdings weniger aussagekräftig als ein klassisches Resistogramm und in der klinischen Diagnostik nicht verbreitet.

In der klinischen Diagnostik von Pilzinfektionen gelten deshalb Mikroskopie und Kultur auf konventionellen Festmedien und chromogenen Medien als Goldstandard. Bei Verdacht auf Blutstrominfektionen erfolgt die Kultur in Blutkulturautomaten. Zur Speziesidentifizierung werden in den meisten Laboren massenspektrometrische Methoden (MALDI-TOF MS) eingesetzt. An die Identifizierung schließt sich eine Resistenztestung mittels E-Test oder Mikrodilution (vgl. Kapitel 2.2.4) an. Diese bewährten Methoden werden ergänzt durch Antigennachweise (z.B. Galactomannan, 1-3- β -D-Glucan) und PCR-Diagnostik für bestimmte Fragestellungen (Groll et al., 2020; Lackner und Lass-Flörl, 2017; Willinger, 2019). Zur Diagnostik von fungalen Blutstrominfektionen sind ergänzend zur Blutkultur

inzwischen beispielsweise kommerzielle qPCR-basierte Methoden (z.B. Septifast, Roche) sowie auch magnetresonanzbasierte Methoden (Candida, T2 Biosystems Lexington, USA) verfügbar (Beyda et al., 2018; Chang et al., 2013).

Für den auch in dieser Arbeit verwendeten Erreger *Candida auris* wurden in den letzten Jahren viele molekularbiologische Identifizierungsmethoden entwickelt, vor allem (quantitative) PCR-Methoden sowie Ansätze (u.a. Sequenziermethoden) zur gezielten Differenzierung von *Candida auris* in Abgrenzung zu nah verwandten Spezies (Ahmad et al., 2019; Arastehfar et al., 2019; Khan et al., 2018; Kordalewska et al., 2017; Leach et al., 2018). Die Notwendigkeit solcher Methoden ergab sich aus den anfänglichen Schwierigkeiten, *C. auris* mittels konventioneller Methoden sicher zu identifizieren.

Für die Testung von Korneatransplantaten bestehen etwas abweichende Anforderungen als für andere klinische Proben: Eine hohe Sensitivität der Testmethode ist hier besonders gewünscht, da die Keimlast von kontaminierten Proben durch die Vorbehandlung mit beispielsweise Povidon-Jod und die Gegenwart von Antibiotika und ggf. Antimykotika als gering einzuschätzen ist. Schnelligkeit bei der Detektion ist ein relevanter Vorteil, denn vor allem Pilzerreger sind manchmal nur schwierig und langsam anzuzüchten und die maximale Lagerzeit des Transplantats ist limitiert. Oben genannte Nachteile, wie das Fehlen eines Resistogramms, sind weniger relevant. Die Entwicklung molekularbiologischer Ansätze zur mikrobiologischen Testung von Korneatransplantaten erscheint vor diesem Hintergrund vielversprechend. Entsprechend finden sich bereits vereinzelt Publikationen mit solchen Ansätzen (Hariya et al., 2017; Kercher et al., 2001; Parekh et al., 2019). Als Ergänzung zu kulturbasierten Methoden könnten molekularbiologische Ansätze die Sensitivität und Geschwindigkeit der Testung verbessern und damit auch einen Beitrag zur Bekämpfung der zunehmenden Rate an Pilzinfektionen nach Keratoplastik leisten.

4.5.1 DNA-Isolation aus Pilzen bzw. aus Kornealagerungsmedium

Es existiert eine Vielzahl molekularbiologischer Methoden zur Pathogendetektion, unter anderem Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit den Varianten quantitative bzw. real-time PCR, nested PCR, Multiplex-PCR, außerdem Kombinationen von PCR mit

Restriktionsfragmentanalysen (RFLP) oder DNA-Mikroarrays, sowie diverse Sequenziermethoden. All diesen verschiedenen Verfahren ist gemeinsam, dass zunächst die Extraktion von DNA aus den Proben nötig ist. Im Gegensatz zu Bakterien verfügen Pilze über eine stabile Zellwand, welche Chitin enthält. Die Lyse und damit Freisetzung von DNA aus Pilzzellen ist daher ein kritischer Schritt. Ohne effiziente DNA-Extraktion ist keine sensitive Testung mittels molekularbiologischer Methoden möglich.

In der Literatur sind vielfältige Methoden zur DNA-Isolation aus Pilzen beschrieben, zudem sind kommerzielle Kits erhältlich (Kumar und Mugunthan, 2018; Löffler et al., 1997; Mazoteras et al., 2015; Metwally et al., 2008; Romanelli et al., 2014). In der Regel erfolgt die Zelllyse mit chemischen, enzymatischen, thermalen oder mechanischen (Kugelmühle, engl.: bead-beating) Methoden, anschließend muss die DNA extrahiert und aufgereinigt werden. Eine ideale Isolationsmethode erzielt dabei eine hohe DNA-Ausbeute bei gleichzeitig hoher Reinheit. In der Praxis ist dies nur begrenzt zu erreichen, es gilt die bestmögliche Balance zwischen diesen beiden Ansprüchen zu finden, sodass die DNA-Isolation und die sich anschließende Methode gemeinsam eine möglichst hohe Sensitivität bei der Detektion erreichen. Soll die Extraktionsmethode auf klinische Proben mit einem Spektrum verschiedener Erreger angewendet werden, ist man zusätzlich mit der Problematik konfrontiert, dass nicht jede Extraktionsmethode bei jedem Erreger vergleichbar gut funktioniert.

Für diese Arbeit wurden verschiedene DNA-Isolationsmethoden getestet (nicht dargestellt). Eine besondere Herausforderung stellte die niedrige Erregermenge in den Proben dar. Viele kommerzielle Kits sind für die DNA-Isolation aus Kultur, also aus hohen Erregerkonzentrationen optimiert und eignen sich nicht gut für niedrig kontaminierte Kornealagerungsproben. Zur Lyse wurden mechanische (bead-beating mit verschiedenen Matrizen) und enzymatische (Zymolyase, Proteinase K) Methoden getestet, und zur anschließenden Aufreinigung die konventionelle Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion sowie verschiedene Silica-Säulen-basierte Kits verwendet. Letztendlich zeigte eine Kombination aus enzymatischer Lyse und anschließender Aufreinigung mit dem Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit (Zymo Research, Freiburg) das beste Ergebnis gemessen an der Reproduzierbarkeit und Sensitivität im anschließenden Erregernachweis durch eine ITS-PCR. Reinheit und DNA-Ausbeute (gemessen mit Spektralphotometer bzw.

Fluorometer) waren bei dieser Methode nicht optimal, jedoch ausreichend für eine Sensitivität in der ITS-PCR von ≤ 10 KBE/ml.

Das übergeordnete Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, die Anwendbarkeit verschiedener Nukleinsäure-basierter Methoden auf die mikrobiologische Testung von Korneatransplantaten zu überprüfen. Die DNA-Isolation wurde deshalb aus Zeitgründen nicht weiter optimiert. Dennoch ist sie essentieller Teil des Workflows bei molekularbiologischen Methoden. Um diese in der Routinediagnostik nutzbar zu machen, müssen weitere Anstrengungen unternommen werden, die DNA-Ausbeute, DNA-Reinheit, usw. zu optimieren. Zu berücksichtigen sind auch Kosten, Geschwindigkeit, potenzielle Risiken durch gesundheitsschädliche Reagenzien (z.B. Phenol, β -Mercaptoethanol) sowie das Potenzial zur Automatisierung (Ahmad et al., 2019).

4.5.2 PCR zur Testung von Kornealagerungsmedium

Die Polymerasekettenreaktion ist eine molekularbiologische Universalmethode zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Durch die Auswahl der Primer wird der zu amplifizierende Bereich definiert. Um die PCR zur Pathogendetektion oder -identifikation einzusetzen, verwendet man universelle Primer, die an konservierte Regionen der Erregergenome binden und hoch variable Bereiche amplifizieren, welche später phylogenetisch analysiert werden können (z.B. 16S-rRNA Analyse) oder Primer, die an möglichst speziesspezifische Sequenzen im Genom der gesuchten Erreger binden. In dieser Arbeit kamen Primer zur Amplifikation der ITS (internal transcribed spacer)-Region zum Einsatz. Die ITS-Region besteht aus den Abschnitten ITS1 und ITS2 und ist zwischen den ribosomalen RNA (rRNA)-Genen lokalisiert. Da Ribosomen notwendige Bestandteile jeder Pilzzelle sind, kommen die dafür kodierenden rRNA-Gene in jedem Pilzgenom in vielen Kopien vor. Sie sind stark konserviert, d.h. sie haben sich im Laufe der Evolution nur wenig verändert und unterscheiden sich zwischen verschiedenen Pilzspezies nur sehr wenig. Demgegenüber stehen die in ihrer Sequenz variablen ITS-Regionen, welche sich hervorragend als Zielregion zur Detektion mittels NAT und zur phylogenetischen Analyse von Pilzspezies eignen (Iwen et al., 2002). In der Regel verwendet man Primer, die in den konservierten rRNA-Gen-Regionen binden und amplifiziert die benachbarten ITS-

Regionen. Anschließend kann man durch weitere Untersuchung der amplifizierten ITS-Regionen (z.B. Längenpolymorphismus, Restriktionsfragmentanalyse, Sequenzierung) eine Speziesidentifikation vornehmen (Chen et al., 2000; Ferrer et al., 2001; Iwen et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde die ITS-Region mithilfe der Primer ITS1 und ITS4 amplifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass mittels dieser Methode die Detektion von artifiziell erzeugten Pilzkontaminationen in Kornealagerungsmedium möglich ist. Darüber hinaus gelang auch die Übertragung auf reale klinische Proben von kontaminiertem Kornealagerungsmedium. Die Detektionsgrenze unter den im Methodenteil geschilderten Versuchsbedingungen betrug ≤ 10 KBE/ml.

Durch die reine Amplifikation der ITS-Region ist nur der Nachweis, nicht aber die Identifizierung von Pilzspezies möglich. Zwar lassen die verschieden langen Amplikons in der ITS-PCR mit klinischen Proben (vgl. Abb. 20) auf das Vorhandensein verschiedener Pilzspezies schließen, die Länge der PCR-Produkte allein lässt aber keine eindeutige Identifizierung zu. Khodadadi et al. (2017) zeigten, dass der Längenpolymorphismus zur Speziesbestimmung eingesetzt werden kann, aber erst die Kombination mehrerer PCR-Produkte eine Identifizierung ermöglicht. Eine Identifizierung mittels ITS-PCR erfordert also mehrere PCR-Schritte oder anschließende Untersuchungen, wie z.B. eine Sequenzierung (vgl. Kapitel 4.6.4).

Möchte man schnell und kostengünstig Nachweis und Identifizierung in einem PCR-Schritt erreichen, muss man Spezies-spezifische Primer verwenden. Dies geschah in dieser Arbeit mit *Candida-albicans*-spezifischen Primern (Palka-Santini et al., 2009). Wie die ITS-PCR lieferten die verwendeten Primer alle PCR-Produkte der erwarteten Länge bei Verwendung von *C. albicans*-DNA und konnten *C. albicans* auch in klinischen Proben nachweisen. Nachteilig bei der Verwendung von spezifischen Primern ist, dass man immer nur diejenigen Pathogene in Proben detektieren kann, für die man Primer eingesetzt hat. Dieses Vorgehen erfordert also Vorwissen über die zu erwartenden Spezies.

Alle in dieser Arbeit getesteten PCR-Assays lieferten Ergebnisse innerhalb eines Tages, inklusive der vorausgehenden DNA-Extraktion. Die Anwendung der hier getesteten PCR-Assays ermöglicht damit im Vergleich zur Kultur eine Reduktion der Detektionszeit von

zum Teil mehreren Tagen auf Stunden, bei einem vergleichbaren Detektionslimit von ≤ 10 KBE/ml.

4.5.3 Quantitative PCR (qPCR) zur Testung von Kornealagerungsmedium

Bei der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen PCR handelt es sich um eine sogenannte Endpunkt-PCR. Das bedeutet, dass die PCR-Produkte erst nach der vorher festgelegten Anzahl an Temperaturzyklen basierend auf ihren Fragmentlängen, zum Beispiel durch Gelelektrophorese, analysiert werden. Eine quantitative PCR verfolgt die Amplifikation in Echtzeit und macht Daten zum Teil schon vor Ende der gewählten Zyklenzahl verfügbar. Eine anschließende Visualisierung der PCR-Produkte auf einem Gel oder mit einer vergleichbaren Methode ist nicht obligat. Die qPCR ermöglicht dadurch im Vergleich zur Endpunkt-PCR eine Reduktion nötiger Arbeitsschritte sowie einen weiteren Zeitgewinn. Außerdem ist mit der qPCR ein quantitativer Nachweis der Erreger möglich, d.h. eine Bestimmung der Erregerlast. In diagnostischen Laboren kommen wegen dieser Vorteile fast nur qPCR-Methoden zum Einsatz.

Die getesteten PCR-Methoden wurden daher auf eine qPCR übertragen. Dies gelang für die PCR mit dem Primerpaar ITS1 und ITS4 unter Verwendung von *C. albicans*-DNA aus mit definierten Keimzahlen versetzten Proben von Kornealagerungsmedium. Die Detektionsgrenze stieg dabei auf $10 - 10^2$ KBE/ml. Dies ist für eine qPCR untypisch, die Methode ist allgemein für ihre hohe Sensitivität bekannt. Im vorliegenden Fall kann die erniedrigte Sensitivität einerseits an der noch nicht optimalen DNA-Isolation im Vorfeld der Amplifizierung liegen, andererseits besteht auch noch Potenzial zur Verbesserung durch Modifikation des PCR-Ansatzes (Polymerase und Master Mix) sowie des Temperaturzyklenprogramms. Eine weitere Optimierung der qPCR wäre somit sehr wahrscheinlich möglich, konnte aus Zeitgründen aber nicht erreicht werden.

4.5.4 Sequenzierung von Proben aus Kornealagerungsmedium

In den letzten Jahren konnten im Bereich des Next Generation Sequencing (NGS) viele Fortschritte bei Kosten, Geschwindigkeit, Komplexität der Probenvorbereitung usw.

erreicht werden. Damit wird die Technologie langfristig auch in der Routinetestung einsetzbar. Vorteile im Vergleich zu (q)PCR-Methoden liegen vor allem im zusätzlichen Informationsgewinn. Die ermittelten Sequenzen können zur Suche nach Resistenzgenen, Virulenzgenen und Mutationen genutzt werden. In Bezug auf Pilze in Kornealagerungsmedium kann hier zum Beispiel ein Screening auf Mutationen in den ERG-Genen (Ergosterolsynthese) und den FKS-Genen (β -D-Glucan-Synthese) sinnvoll sein, welche zu Polyen-, Azol- und Echinocandinresistenzen führen können. Bei Vorhandensein solcher Mutationen, deren Prävalenz zunimmt, könnten Pilze auch in Antimykotika-supplementiertem Kornealagerungsmedium persistieren.

Besondere Vorteile der Sequenzierung zeigen sich auch bei der Suche nach seltenen Erregern: Während eine PCR immer nur diejenigen Pathogene detektieren kann, für die ihre Primer designt wurden und auch Kulturmethoden nur diejenigen Pathogene detektieren, die unter den gewählten Bedingungen kultivierbar sind, ermöglichen sequenzierungs-basierte Ansätze auch die Detektion seltener oder sogar noch völlig unbekannter Pathogene. Diese universelle Detektion erreicht man jedoch nur bei sogenannten metagenomischen Ansätzen, bei denen der Sequenzierung keine Amplifikation vorangestellt wird (Gu et al., 2019). Für die Routinediagnostik eignet sich das Sequenzieren von Amplikons meist besser, da die entstehenden Datenmengen und Anforderungen an die bioinformatische Auswertung geringer und Aufwand und Kosten niedriger sind. Bei der Amplikon-Sequenzierung geht der eigentlichen Sequenzierung eine Amplifikation, zum Beispiel von 16S- oder ITS-Region oder spezifischen Zielregionen, voraus. Dieser Ansatz wurde auch hier gewählt: Es konnte gezeigt werden, dass der Workflow, bestehend aus DNA-Extraktion aus kontaminiertem Kornealagerungsmedium, anschließender ITS-PCR und der Sequenzierung des PCR-Produktes, erfolgreich die Gegenwart von *Candida albicans* im Kornealagerungsmedium detektieren kann. Dieser Ansatz ist für die klinische Routinetestung beliebig erweiterbar, zum Beispiel durch eine Multiplex-PCR zur Detektion vieler verschiedener Pathogene (aktuelles Ziel unserer Arbeitsgruppe).

Zur Sequenzierung wurde hier die MinION-Technologie (Oxford Nanopore Technologies) gewählt. Sie basiert anders als andere NGS-Methoden nicht auf einer Sequenzierung durch Synthese eines neuen DNA-Stranges sondern auf biologischen Nanoporen, durch die DNA-Einzelstränge hindurchlaufen. Das ermöglicht die Bestimmung der Basenabfolge in Echtzeit, was Ergebnisse schnell verfügbar macht. Insgesamt benötigt die hier gezeigte

Detektionsmethode inklusive DNA-Extraktion, ITS-PCR, Probenaufbereitung für die Sequenzierung, Sequenzierung auf einer MinION-Flowcell und Datenauswertung maximal 2 Arbeitstage. Durch Prozessoptimierung und Automatisierung einzelner Arbeitsschritte wäre eine weitere Zeitreduktion denkbar. Verglichen mit der konventionellen Kulturmethode bedeutet dies einen großen Zeitgewinn. Hinsichtlich der Sensitivität war die hier durchgeführte Technik noch nicht optimal. Die ITS-PCR zeigte keine gute Sensitivität. Im Gegensatz zur ursprünglichen ITS-PCR (vgl. Kapitel 3.4.1), bei der auch in Proben mit 10^3 KBE/ml stets PCR-Produkte nachweisbar waren, war dies hier nur bei Proben mit 10^3 bis 10^6 KBE/ml der Fall. Es wurde aus Zeitgründen nicht experimentell evaluiert, welche Gründe dafür vorlagen. Denkbar sind, dass die eingesetzte DNA nicht optimal extrahiert wurde oder, dass das im Gegensatz zur vorher beschriebenen ITS-PCR etwas veränderte PCR-Programm oder die abweichend verwendete Polymerase (vgl. Kapitel 2.2.8.5) zu einer weniger effizienten Amplifikation geführt hat. Prinzipiell haben molekularbiologische Ansätze Potenzial zu einer enorm hohen Sensitivität bei der Pathogendetektion. Jedoch ist dies auch mit Problemen bei der Ergebnisinterpretation verbunden, was sich in anderen Versuchen, NGS auf Kornealagerungsmedium oder andere okuläre Proben anzuwenden zeigte: Eguchi et al. (2017) wandten NGS auf 16S Amplikons gewonnen aus Kontaktlinsenlagermedium an. Im Vergleich zur Kulturmethode detektierten sie mittels NGS eine deutlich größere Anzahl verschiedener Pathogene in der gleichen Probe. Parekh et al. (2019) verfolgten ähnlich wie in dieser Arbeit das Ziel, Kornealagerungsmedium mittels NGS auf Kontaminanten zu testen. Mit einer Kombination aus 16S- und 18S- Amplikon-Sequenzierung detektierten sie eine Vielzahl an Pathogenen, während die gleichen Proben in einem konventionellen Kulturautomaten alle negativ blieben. Die hohe Sensitivität der Methoden kombiniert mit der Gefahr exogener Kontaminationen stellt hohe Anforderungen an die Ergebnisbewertung. Nicht jede detektierte Bakterien- oder Pilz-DNA stammt wirklich aus der Ausgangsprobe. Zudem muss sie auch nicht von vitalen Mikroorganismen stammen und selbst wenn, bedeutet dies nicht unbedingt, dass der Erreger nach der Transplantation fähig ist, eine Infektion auszulösen. Daher erfordern diese Methoden sterile, möglichst DNA-kontaminationsfreie Arbeitsabläufe, räumliche Trennung von prä- und post-Amplifikationsarbeitsschritten sowie die Etablierung eines geeigneten Umgangs mit den Sequenzierergebnissen. Helfen können dabei Informationen über die

natürliche Standortflora der Kornea und auf Basis dessen eine sinnvolle Zusammenstellung der Primer für die der Sequenzierung vorangestellten Amplifikation.

4.6 Limitationen und anknüpfende Fragestellungen

Neben teilweise bereits in den jeweiligen Abschnitten angesprochenen Limitationen dieser Arbeit sollen in diesem Kapitel einige weitere Aspekte genannt werden, welche auch Fragestellungen künftiger Forschungsprojekte sein könnten.

Zunächst müssen bei allen Experimenten die Grenzen der Methoden beachtet werden. Im kulturbasierten Teil dieser Arbeit lässt die Keimzahlbestimmung durch Koloniezählung auf Agarplatten lediglich eine Aussage über die Zahl vermehrungsfähiger Zellen zu. Abgetötete oder aus anderen Gründen nicht auf der Agarplatte wachsende Zellen werden nicht erfasst. Dies kann beim direkten Vergleich mit molekularbiologischen Methoden, wie sie im zweiten Teil dieser Arbeit verwendet wurden, zu abweichenden Ergebnissen führen. DNA-basierte Methoden unterscheiden nicht zwischen vitalen und toten Erregern, sofern keine zusätzlichen Maßnahmen ergriffen werden. Die Koloniezählungsmethode setzt zudem voraus, dass jede lebende Zelle genau eine makroskopisch sichtbare Kolonie auf der Agarplatte formt, was erregerabhängig nicht immer der Fall ist.

Methodisch muss außerdem betont werden, dass in dieser Arbeit ausschließlich Kornealagerungsmedium auf Kontamination getestet wurde. Das eigentliche Transplantat, das Korneagewebe, wurde nicht untersucht. Es ist bisher nicht klar, welche Rolle Biofilmbildung und Adhäsion an das Gewebe spielen. Auch die Frage potenzieller Gewebeschädigungen durch antimykotische Zusätze (vgl. Kapitel 4.3) wurde in anderen Arbeiten bearbeitet und war nicht Gegenstand der hier durchgeführten Experimente (Duncan et al., 2016; Giurgola et al., 2019; Layer et al., 2014; Tran et al., 2020).

Die beschriebenen Experimente wurden im Wesentlichen mit dem Erreger *Candida albicans* (Stamm ATCC 10231) durchgeführt, da dieser in verschiedenen Arbeiten als häufigster Erreger bei Pilzinfektionen nach Korneatransplantationen identifiziert wurde (Aldave et al., 2013; Keyhani et al., 2005; Sutphin et al., 2002; Vislisel et al., 2017). *C. auris* kam in einigen Experimenten ergänzend zum Einsatz, *C. glabrata* und *C. tropicalis* nur im Rahmen der Resistenzbestimmungen. Auch wenn *C. albicans* aufgrund seines

häufigen Auftretens von besonderem Interesse ist, sollten in zukünftigen Arbeiten auch andere Erreger bedacht werden. Hierbei ist die zunehmende Bedeutung von non-*albicans* *Candida*-Arten zu beachten sowie die Rolle filamentöser Pilze (u.a. *Aspergillus spp.*). Als Antimykotikum wurde hauptsächlich Amphotericin B untersucht. Eine Übertragung der Versuche auf andere Antimykotika (-Kombinationen) wäre sinnvoll, wobei dies zum Teil von anderen Autoren durchgeführt wurde (vgl. Kapitel 4.4).

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden zur Detektion von Pilzkontaminationen bieten eine Vielzahl anknüpfender Fragestellungen:

Bei der PCR wäre eine Ausweitung des Singleplex-PCR-Ansatzes auf eine Multiplex-PCR denkbar. Durch Multiplex-Ansätze, also die Kombination mehrerer Primerpaare in einer PCR-Reaktion, ist es möglich eine große Anzahl von Pathogenen abzudecken. Zur Detektion von Pathogenen in Korneatransplantaten könnte man eine Auswahl an Primern häufiger Kontaminanten (Pilze, Bakterien) zusammenstellen und diese mit einer Multiplex-PCR in Kornealagerungsmedium detektieren. Einen solchen Ansatz verfolgten Hariya et al. (2017), allerdings verwendeten sie drei getrennte PCRs zur Detektion von Viren, Bakterien und Pilzen in Korneaprobe. Eine Multiplex-PCR kann auch als Basis für anschließende Amplikonsequenzierung dienen.

Bei der in dieser Arbeit dargestellten qPCR wäre durch weitergehende Bestrebungen sehr wahrscheinlich eine Verbesserung von Sensitivität und Reproduzierbarkeit möglich. Dies konnte aufgrund der limitierten Zeit für diese Arbeit nicht verwirklicht werden. Zudem bietet die qPCR weitere Modifikationsmöglichkeiten: In dieser Arbeit wurde der Farbstoff „SYBR GREEN®“ (Roche) gewählt, welcher nicht spezifisch an die Target-DNA, sondern an jegliche doppelsträngige DNA (auch unspezifische Nebenprodukte) bindet. Dieser Nachteil kann begrenzt durch eine Schmelzkurvenanalyse ausgeglichen werden, alternativ wäre der Wechsel zu einem spezifischen Sonden-Farbstoff (z.B. TaqMan, Hybridisierungssonden) möglich. Auch die Möglichkeit der Quantifizierung der Erregermenge durch eine qPCR wurde in dieser Arbeit nicht ausgeschöpft. Prinzipiell ermöglicht die qPCR mithilfe einer Standardreihe vom ermittelten Ct-Wert einer Probe auf die ursprüngliche DNA-Menge, die Anzahl genomischer Äquivalente und damit auf die in der Ausgangsprobe enthaltene Erregeranzahl zu schließen. Dies gelang hier noch nicht zufriedenstellend (Ergebnisse nicht dargestellt). Da die genaue Erregerzahl für die Beurteilung von Kornea-

transplantaten nicht vorrangig ist, wurde dieses Ziel nicht weiter verfolgt. Eine Quantifizierung erscheint auch in der Zukunft nur dann sinnvoll, wenn ein Konsens über ggf. tolerierbare Erregermengen in Korneatransplantaten gefunden wird.

In Anbetracht der hohen Sensitivität molekularbiologischer Methoden stellt sich die Frage, ob und wie man (erregerspezifische) Cut-off-Werte definieren kann, d.h. ob der Nachweis geringfügiger Erregermengen eventuell tolerierbar ist, um übermäßiges Verwerfen von Transplantaten bei bestehender Spenderknappheit zu verhindern. Helfen können dabei ggf. die oben dargestellten Quantifizierungsmöglichkeiten sowie die Erregeridentifikation, welche eine Differenzierung von physiologischer Standortflora und Pathogenen ermöglichen kann. Längst nicht jede in Lagermedium festgestellte Kontamination führt zu einer Infektion beim Empfänger (Broniek et al., 2018). Welche Mechanismen und Kriterien (z.B. Keimlast, Erregerspezies, prophylaktische Antibiotika- und Antimykotikagabe, etc.) für die Infektion oder das Ausbleiben einer Infektion im Empfänger verantwortlich sind, ist wichtiger Gegenstand zukünftiger Forschung. Ein besseres Verständnis all dieser Vorgänge kann dabei helfen, die Gratwanderung zwischen maximaler Empfängersicherheit und der Gefahr unnötiger Verschwendung des knappen Bestandes an Korneatransplantaten zu erleichtern.

5 Zusammenfassung

Korneatransplantationen gehören zu den am häufigsten durchgeführten Transplantationen. In den letzten Jahren wurde dabei ein Anstieg der Inzidenz von postoperativen Infektionen durch Pilze festgestellt, welche eine schwere Komplikation darstellen. Aktuell werden der Einfluss der Lagermethode der Korneae und die Effekte von Antimykotika in Kornealagerungsmedium auf die Infektionsrate diskutiert.

In dieser Arbeit wurde die Effektivität des Antimykotikums Amphotericin B hinsichtlich der Reduktion von Kontaminanten in Kornealagerungsmedium untersucht. Dazu wurde Kornealagerungsmedium experimentell mit Pilzen versetzt und die Bioburden-Reduktion bei Einsatz verschiedener Konzentrationen von Amphotericin B bei hypothermer Lagerung und Organkultur beobachtet. Bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml Amphotericin B kam es in Organkultur bei initialer Keimlast von 10 bis 10⁴ KBE/ml *C. albicans* innerhalb von 5 Tagen zur Elimination (Detektionslimit ≤10 KBE/ml im Kulturautomaten). Durch die Koloniezählmethode auf Agarplatten konnte bei 2,5 und 1,25 µg/ml Amphotericin B zudem schon nach 2 Stunden bzw. 3 Tagen eine Reduktion der Keimlast unter das Detektionslimit (≤70 KBE/ml) beobachtet werden. Bei hypothermer Lagerung konnte hingegen durch keine der getesteten Konzentrationen (0,25 bis 2,5 µg/ml) eine vollständige Elimination der Pilze bis Tag 5 erreicht werden.

Beim Nachweis von Pilzkontaminanten im Kulturautomaten (BacT/ALERT®) kam es während des Detektionsvorgangs selbst nicht zu Störeffekten durch Amphotericin B im Kornealagerungsmedium..

Hypotherme Lagerung verhinderte jedoch die Vermehrung von Pilzkontaminanten während der Lagerzeit und führte über die dadurch niedrige Keimlast zum Testzeitpunkt zu verlängerten Detektionszeiten im Kulturautomaten. Bei Verwendung von amphotericinhaltigem Medium verlängerten sich die Detektionszeiten zusätzlich. Proben aus Organkultur (37 °C) zeigten zum Testzeitpunkt hingegen entweder eine hohe Keimlast und dadurch kurze Detektionszeiten oder, bei Amphotericinzugabe, durch die effiziente Keimelimination, keinen Erregernachweis.

Insgesamt erscheint aus mikrobiologischer Sicht die Lagerung von Korneatransplantaten in Organkultur mit amphotericinhaltigem Medium (1,25 oder 2,5 µg/ml) als sicherste

Lagermethode. Niedrigere Amphotericinkonzentrationen sollten nicht verwendet werden. Bei Versagen der Wirkung von Amphotericin B, zum Beispiel bei resistenten Pilzspezies, können Kontaminationen aufgrund der wachstumsfördernden Lagerungstemperatur schnell durch die Testung in Kulturautomaten nachgewiesen werden. Hypotherme Lagerung (4 °C) wirkte sich negativ auf die Wirksamkeit des Antimykotikums aus und führte darüber hinaus zu längeren Detektionszeiten.

Im molekularbiologischen Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Detektion von Pilzkontaminanten in Kornealagerungsmedium mittels Nukleinsäure-basierter Methoden möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass dies sowohl durch eine ITS-PCR (Detektionslimit ≤ 10 KBE/ml) als auch mittels spezies-spezifischer PCR-Ansätze (*C. albicans*) gelingt. Die Detektion war außerdem erfolgreich mit einer quantitativen ITS-PCR (Detektionslimit $10 - 10^2$ KBE/ml). Durch Nanoporen-Sequenzierung von PCR-Produkten konnte zudem die Identität von Kontaminanten (hier *C. albicans*) bestimmt werden. Als vorteilhaft erwiesen sich bei den molekularbiologischen Methoden die Geschwindigkeit der Detektion und der zusätzliche Informationsgewinn (Resistenzgene, Identität der Erreger). Zukünftig könnten die genannten Methoden nach weiterer Optimierung eine sinnvolle Ergänzung zur bisherigen kulturbasierten Testung darstellen und zur Verbesserung der Patientensicherheit bei Korneatransplantationen beitragen.

6 Anhang

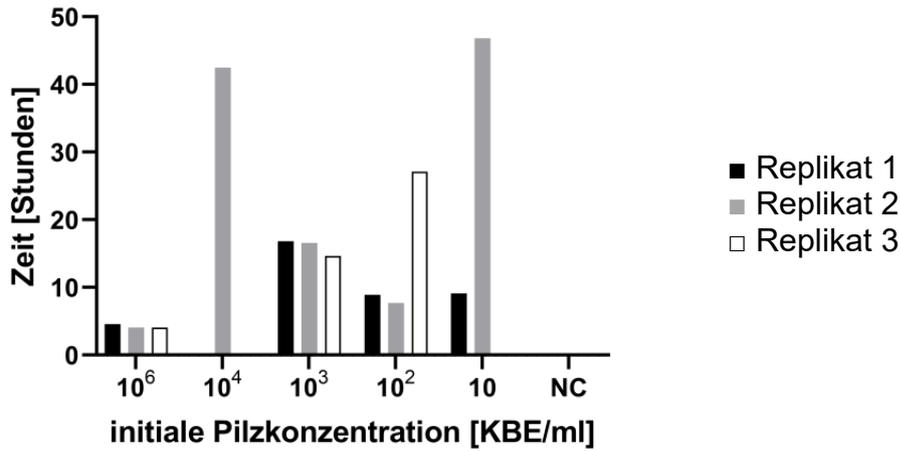


Abb. 22: *C. albicans* Detektionszeiten (engl.: „Time-to-Detection“) in anaeroben BacT/ALERT Kulturautomatenflaschen im Rahmen des Kontaminationsversuchs (vgl. Abb. 2 und 8) ohne Amphotericin B unter Organkulturbedingungen. Die Kulturautomatenflaschen wurden mit an Tag 5 des Kontaminationsversuchs entnommenen Proben beimpft. Es handelt sich demnach um Proben von mit definierten Pilzkonzentrationen versetztem Kornealagerungsmedium nach 5 d Lagerung bei 37 °C. Ist kein Wert abgebildet, wurde die Flasche bis zum Ende des Detektionszeitraumes (7 d) nicht als „positiv“ erkannt und somit als „negativ“ bewertet. Für die Ergebnisse in aeroben Kulturautomatenflaschen vgl. Abb. 9 B. n=3.

NC: Negativkontrolle (Kornealagerungsmedium ohne Pilzinokulum)

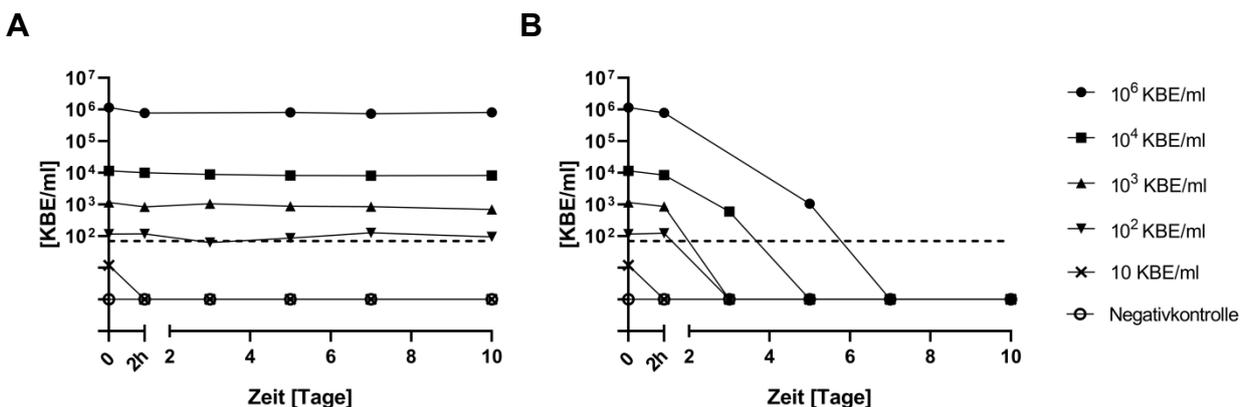


Abb. 23, A+B: Entwicklung der *C. auris* Keimzahlen (Mittelwert ± Standardabweichung) in experimentell mit *C. auris* versetztem Kornealagerungsmedium mit bzw. ohne 2,5 µg/ml Amphotericin B bei hypothermer Lagerung (4 °C). n=1. **A:** Medium ohne Amphotericin B, **B:** Medium mit 2,5 µg/ml Amphotericin B

Detektionslimit 70 KBE/ml (gestrichelte Linie in A-D).

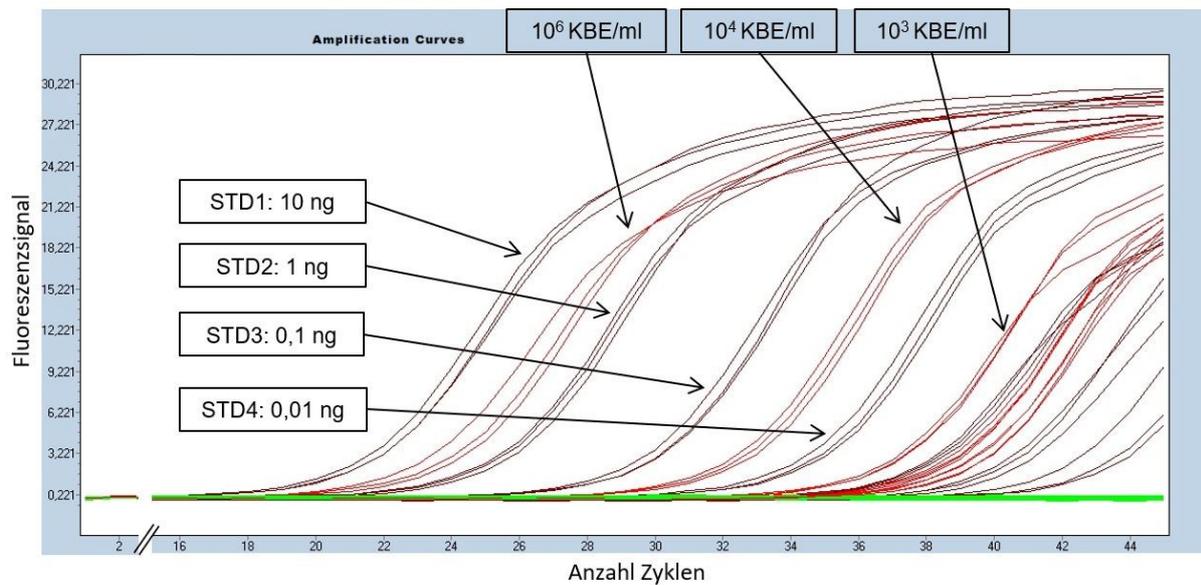


Abb. 24: Exemplarische Darstellung von Amplifikationskurven einer qPCR. Versuchsdurchlauf mit einer Standardreihe und *C. albicans*-DNA-Proben aus kontaminiertem Kornealagerungsmedium. Jeweils 3 technische Replikate. Beschriftet sind nur exemplarisch einige Proben. STD: 0,01 bis 10 ng *C. albicans*-DNA-Standard. 10⁶ KBE/ml, 10⁴ KBE/ml, 10³ KBE/ml: Pilz-Konzentration des Kornealagerungsmediums, aus der die DNA-Proben isoliert wurden.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Beispielhafte Plattenbelegung für die Resistenztestung mittels Mikrodilution	33
Abb. 2: Übersicht Versuchsaufbau Kontaminationsversuche mit <i>Candida spp.</i> in Kornealagerungsmedium	36
Abb. 3: Übersicht Versuchsaufbau modifizierte Kontaminationsversuche mit <i>Candida spp.</i> in Kornealagerungsmedium	37
Abb. 4: Lokalisation der ITS-Region zwischen den rRNA-Genen 18S, 5.8S und 28S und Position der zur Amplifikation dieser Region verwendeten Primer ITS1 und ITS4	40
Abb. 5: Exemplarische Darstellung einer Standardreihe (lineare Regression) bei der qPCR.	45
Abb. 6: MHK-Bestimmung mittels Mikrodilutionsmethode für <i>C. auris</i> (DSM 21092) und Amphotericin B bzw. Fluconazol	50
Abb. 7: Exemplarische Darstellung der MHK-Bestimmung mittels E-Tests	51
Abb. 8: Entwicklung der <i>C. albicans</i> Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit <i>C. albicans</i> versetztem Kornealagerungsmedium mit bzw. ohne 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B bei verschiedenen Lagertemperaturen	54
Abb. 9: <i>C. albicans</i> Detektionszeiten (engl.: „Time-to-Detection“) in aeroben BacT/ALERT Kulturautomatenflaschen im Rahmen des Kontaminationsversuchs	55
Abb. 10: Entwicklung der <i>C. albicans</i> Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit <i>C. albicans</i> versetztem Kornealagerungsmedium mit verschiedenen Amphotericinkonzentrationen bei hypothermer Lagerung (4 °C)	58

- Abb. 11: Entwicklung der *C. albicans* Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium mit verschiedenen Amphotericin-konzentrationen bei Organkulturbedingungen (37 °C), dargestellt gruppiert nach Amphotericinkonzentration 59
- Abb. 12: Entwicklung der *C. albicans* Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium mit verschiedenen Amphotericin-konzentrationen (0,25 μ g/ml, 1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml und amphotericinfrei) bei Organkulturbedingungen (37 °C), dargestellt gruppiert nach initialem Inokulum 61
- Abb. 13: *C. auris* Detektionszeiten (engl.: „Time-to-Detection“) für aerobe BacT/ALERT Kulturautomatenflaschen im Rahmen des Kontaminationsversuchs 62
- Abb. 14: *C. albicans* Detektionszeiten („Time-to-Detection“) in aeroben BacT/ALERT Kulturautomatenflaschen in An- bzw. Abwesenheit von Amphotericin B 64
- Abb. 15: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten der eukaryotischen ITS-Region, amplifiziert mit Primerpaar ITS1 + ITS4 65
- Abb. 16: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten nach PCR mit Primerpaar ITS1 + ITS4 und DNA Proben isoliert aus experimentell mit verschiedenen definierten *C. albicans*-Konzentrationen versetztem Kornelagerungsmedium (amphotericinhaltig bzw. amphotericinfrei) 66
- Abb. 17: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten bei Verwendung von *C. albicans*-spezifischen Primerpaaren und *C. albicans*-DNA aus Übernachtskultur zur Amplifikation von *RBT4*, *RIM8*, *BGL2*, *MNT1*, *GNA1* 68

- Abb. 18: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten nach PCR mit Primerpaar ITS1 + ITS4 und DNA-Proben isoliert aus zwei klinischen Proben von kontaminierten Kornealagerungsmedien 69
- Abb. 19: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten bei Verwendung von DNA-Proben isoliert aus zwei klinischen Proben von kontaminierten Kornealagerungsmedien und *C. albicans*-spezifischen Primerpaaren zur Amplifikation von *RBT4*, *RIM8*, *BGL2*, *MNT1* und *GNA1* 70
- Abb. 20: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten nach PCR mit Primerpaar ITS1 + ITS4 sowie DNA isoliert aus 16 klinischen Proben (Kornealagerungsmedien verworfener Transplantate) 71
- Abb. 21: Virtuelles Elektrophoresebild mit nebenstehender Legende der PCR-Produkte der ITS-PCR mit den Primern ITS1 und ITS4 und DNA isoliert aus mit *C. auris* und *C. albicans* versetztem Kornealagerungsmedium 74
- Abb. 22: *C. albicans* Detektionszeiten (engl.: „Time-to-Detection“) in anaeroben BacT/ALERT Kulturautomatenflaschen im Rahmen des Kontaminationsversuchs 104
- Abb. 23: Entwicklung der *C. auris* Keimzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in experimentell mit *C. auris* versetztem Kornealagerungsmedium mit bzw. ohne 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B bei hypothermer Lagerung (4 °C) 104
- Abb. 24: Exemplarische Darstellung von Amplifikationskurven einer qPCR 105

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Nährmedien	23
Tab. 2: Puffer, Medienzusätze, Chemikalien	23
Tab. 3: Antimykotika	24
Tab. 4: Materialien zur DNA-Isolation	24
Tab. 5: Materialien für PCR, qPCR und Gelelektrophorese	24
Tab. 6: Materialien für die Sequenzierung	25
Tab. 7: Primer ITS-Region	25
Tab. 8: <i>Candida</i> spezifische Primer (aus Palka-Santini et al., 2009)	26
Tab. 9: Verwendete Pilzstämme, genaue Kennzeichnung und Bezugsorganisation	26
Tab. 10: Verbrauchsmaterialien	27
Tab. 11: Laborgeräte	28
Tab. 12: Verwendete Software	30
Tab. 13: PCR-Ansatz zur Amplifikation der ITS-Region mit den Primern ITS1 und ITS4	41
Tab. 14: PCR-Programm zur Amplifikation der ITS-Region mit den Primern ITS1 und ITS4	41
Tab. 15: PCR-Ansatz für PCR mit spezifischen <i>C. albicans</i> -Primern	42
Tab. 16: PCR-Programm für PCR mit spezifischen <i>C. albicans</i> -Primern	42
Tab. 17: Ansatz qPCR	44
Tab. 18: Programm qPCR	44
Tab. 19: PCR-Ansatz ITS-PCR für Sequenzierung	46
Tab. 20: PCR-Ansatz Multiplex-PCR <i>C. albicans</i>	46
Tab. 21: PCR-Programm Sequenzierungs-PCR	46

Tab. 22: Übersicht über die ermittelten MHK-Werte aller getesteten Stämme mit den Methoden Mikrodilution und E-Test	52
Tab. 23: Ct-Werte (Mittelwert und Standardabweichung) bei qPCR mit den Primern ITS1 und ITS4 und DNA isoliert aus mit unterschiedlichen Konzentrationen <i>C. albicans</i> versetztem Kornealagerungsmedium	72

9 Literaturverzeichnis

- Ahmad A, Spencer JE, Lockhart SR, Singleton S, Petway DJ, Bagarozzi DA, Herzegh OT. A high-throughput and rapid method for accurate identification of emerging multidrug-resistant *Candida auris*. *Mycoses* 2019; 62: 513–518
- Albon J, Armstrong M, Tullo AB. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea* 2001; 20: 260–263
- Aldave AJ, DeMatteo J, Glasser DB, Tu EY, Iliakis B, Nordlund ML, Misko J, Verdier DD, Yu F. Report of the Eye Bank Association of America medical advisory board subcommittee on fungal infection after corneal transplantation. *Cornea* 2013; 32: 149–154
- Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, Castanheira M, Messer SA, Perlin DS, Pfaller MA. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 1724–1732
- Arastehfar A, Fang W, Daneshnia F, Al-Hatmi AM, Liao W, Pan W, Khan Z, Ahmad S, Rosam K, Lackner M, Lass-Flörl C, Hagen F, Boekhout T. Novel multiplex real-time quantitative PCR detecting system approach for direct detection of *Candida auris* and its relatives in spiked serum samples. *Future Microbiol* 2019; 14: 33–45
- Armitage WJ. Preservation of Human Cornea. *Transfus Med Hemother* 2011; 38: 143–147
- Armitage WJ, Easty DL. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 16–24
- Armitage WJ, Jones MNA, Zambrano I, Carley F, Tole DM. The suitability of corneas stored by organ culture for penetrating keratoplasty and influence of donor and recipient factors on 5-year graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 784–791
- Beyda ND, Amadio J, Rodriguez JR, Malinowski K, Garey KW, Wanger A, Ostrosky-Zeichner L. In Vitro Evaluation of BacT/Alert FA Blood Culture Bottles and T2Candida Assay for Detection of *Candida* in the Presence of Antifungals. *J Clin Microbiol* 2018; 56

Bograd A, Seiler T, Droz S, Zimmerli S, Früh B, Tappeiner C. Bakterielle und mykotische Keratitis: eine retrospektive Analyse an einer Schweizer Universitätsklinik. *Klin Monbl Augenheilkd* 2019; 236: 358–365

Bolotin-Fukuhara M, Fairhead C. Editorial: *Candida glabrata*, the other yeast pathogen. *FEMS Yeast Res* 2016; 16: fov116

Borg-von Zepelin M, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M, Gross U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 424–428

Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 183–188

Breazzano MP, Tooley AA, Godfrey KJ, Jacob CE, Yannuzzi NA, Flynn HW. *Candida auris* and endogenous panophthalmitis: clinical and histopathological features. *American Journal of Ophthalmology Case Reports* 2020; 19: 100738

Broniek G, Langwińska-Wośko E, Sybilska M, Szaflik J, Szaflik JP, Wróblewska M. Prevalence of bacteria and fungi in samples of cornea preservation fluid. *Arch Med Sci* 2018; 14: 541–546

Brothers KM, Shanks RMQ, Hurlbert S, Kowalski RP, Tu EY. Association Between Fungal Contamination and Eye Bank-Prepared Endothelial Keratoplasty Tissue: Temperature-Dependent Risk Factors and Antifungal Supplementation of Optisol-Gentamicin and Streptomycin. *JAMA Ophthalmol* 2017; 135: 1184–1190

Bundesärztekammer, Paul-Ehrlich-Institut. Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank, Erste Fortschreibung. *Dtsch Arztebl* 2018; 111

Cadnum JL, Shaikh AA, Piedrahita CT, Sankar T, Jencson AL, Larkin EL, Ghannoum MA, Donskey CJ. Effectiveness of Disinfectants Against *Candida auris* and Other *Candida* Species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017; 38: 1240–1243

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2020. *Candida auris*. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/index.html> (Zugriffsdatum: 20.03.2020)

- Chang S-S, Hsieh W-H, Liu T-S, Lee S-H, Wang C-H, Chou H-C, Yeo YH, Tseng C-P, Lee C-C. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis - a systemic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8: e62323
- Chen JY, Jones MN, Srinivasan S, Neal TJ, Armitage WJ, Kaye SB. Endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 2015; 122: 25–30
- Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2302–2310
- Chiang TT-K, Shtein RM, McCoy K, Hurlbert S, Grossman GH. Cost-Benefit and Cost-Utility Analysis of Amphotericin B Supplementation of Corneal Storage Media With Endothelial Keratoplasty-Prepared Tissue. *Cornea* 2020; 39: 422–430
- Chowdhary A, Anil Kumar V, Sharma C, Prakash A, Agarwal K, Babu R, Dinesh KR, Karim S, Singh SK, Hagen F, Meis JF. Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 919–926
- Chu YI, Penland RL, Wilhelmus KR. Colorimetric indicators of microbial contamination in corneal preservation medium. *Cornea* 2000; 19: 517–520
- Cobos-Trigueros N, Kaasch AJ, Soriano A, Torres J-L, Vergara A, Morata L, Zboromyrska Y, La Calle C de, Alejo I, Hernández C, Cardozo C, Marco F, Del Río A, Almela M, Mensa J, Martínez JA. Time to positivity and detection of growth in anaerobic blood culture vials predict the presence of *Candida glabrata* in candidemia: a two-center European cohort study. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3082–3084
- Cursiefen C, Heindl LM. Perspektiven der tiefen anterioren lamellären Keratoplastik. *Ophthalmologie* 2011; 108: 833–839
- Cursiefen C, Kruse FE. Posteriore lamelläre Keratoplastik (DSAEK). *Ophthalmologie* 2009; 106: 939-52
- Cursiefen C, Kruse FE. DMEK: posteriore lamelläre Keratoplastiktechnik. *Ophthalmologie* 2010; 107: 370–376

Davila JR, Mian SI. Infectious keratitis after keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol* 2016; 27: 358–366

Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation. 2019. Jahresbericht 2018. <https://gewebenetzwerk.de/wp-content/uploads/2019/06/DGFG-Jahresbericht-2018.pdf> (Zugriffsdatum: 04.11.2020)

Deutsches Institut für Normung e.V... Sterilisation von Produkten für die Gesundheitsfürsorge - Mikrobiologische Verfahren. Teil 1: Bestimmung der Population von Mikroorganismen auf Produkten. <https://www.din.de/de/wdc-beuth:din21:326261575> (Zugriffsdatum: 04.11.2021)

Drenckhahn D, Rager G. Visuelles System. In: Drenckhahn D, Hrsg. *Anatomie*. München: Elsevier Urban & Fischer, 2004: 667-671

Du DT, Wagoner A, Barone SB, Zinderman CE, Kelman JA, MaCurdy TE, Forshee RA, Worrall CM, Izurieta HS. Incidence of endophthalmitis after corneal transplant or cataract surgery in a medicare population. *Ophthalmology* 2014; 121: 290–298

Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, Montigny J de, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich J-M, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, Daruvar A de, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud J-M, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard G-F, Straub M-L, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolutin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet J-L. Genome evolution in yeasts. *Nature* 2004; 430: 35–44

Dumitru R, Hornby JM, Nickerson KW. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2350–2354

Duncan K, Parker J, Hoover C, Jeng BH. The Effect of Light Exposure on the Efficacy and Safety of Amphotericin B in Corneal Storage Media. *JAMA Ophthalmol* 2016; 134: 432–436

Durand ML. Bacterial and Fungal Endophthalmitis. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30: 597–613

Edelstein SL, DeMatteo J, Stoeger CG, Macsai MS, Wang C-H. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on Adverse Reactions Reported From 2007 to 2014. *Cornea* 2016; 35: 917–926

Eguchi H, Hotta F, Kuwahara T, Imaohji H, Miyazaki C, Hirose M, Kusaka S, Fukuda M, Shimomura Y. Diagnostic Approach to Ocular Infections Using Various Techniques From Conventional Culture to Next-Generation Sequencing Analysis. *Cornea* 2017; 36 Suppl 1: S46-S52

Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49 Suppl 1: 7–10

Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; 55: 809–818

Ericson E-L, Klingspor L, Ullberg M, Ozenci V. Clinical comparison of the Bactec Mycosis IC/F, BacT/Alert FA, and BacT/Alert FN blood culture vials for the detection of candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73: 153–156

EUCAST. 2020a. E.DEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. <https://www.eucast.org/astoffungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/> (Zugriffsdatum: 01.03.2020)

EUCAST. 2020b. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/> (Zugriffsdatum: 07.12.2020)

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2018. Candida auris in healthcare settings - Europe. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-candida-auris-healthcare-settings-europe#copy-to-clipboard> (Zugriffsdatum: 05.11.2020)

European Eye Bank Association. 2018. Annual Directory. <https://www.eeba.eu/eeba-infoservice/downloads> (Zugriffsdatum: 14.10.2019)

- European Eye Bank Association. 2019. EEBA Technical Guidelines for Ocular Tissue. https://www.eeba.eu/files/pdf/EEBA_Technical_Guidelines_for_Ocular_Tissue_Revision11.pdf (Zugriffsdatum: 06.11.2020)
- Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE. Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64: 402–407
- Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2873–2879
- Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 80–96
- Flockerzi E, Maier P, Böhringer D, Reinshagen H, Kruse F, Cursiefen C, Reinhard T, Geerling G, Torun N, Seitz B. Trends in Corneal Transplantation from 2001 to 2016 in Germany: A Report of the DOG-Section Cornea and its Keratoplasty Registry. *Am J Ophthalmol* 2018; 188: 91–98
- Fontana L, Errani PG, Zerbinati A, Musacchi Y, Di Pede B, Tassinari G. Frequency of positive donor rim cultures after penetrating keratoplasty using hypothermic and organ-cultured donor corneas. *Cornea* 2007; 26: 552–556
- Fontana L, Moramarco A, Mandarà E, Russello G, Iovieno A. Interface infectious keratitis after anterior and posterior lamellar keratoplasty. Clinical features and treatment strategies. A review. *Br J Ophthalmol* 2019; 103: 307–314
- Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, Thuret G. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol* 2016; 134: 167–173
- Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin AC, Carricajo A, Acquart S, Maugery J, Aubert G. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 1158–1162
- George BJ, Horvath LL, Hospenthal DR. Effect of inoculum size on detection of *Candida* growth by the BACTEC 9240 automated blood culture system using aerobic and anaerobic media. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 433–435

- Gibbons A, Leung EH, Yoo SH. Cost-Effectiveness of Antifungal Supplementation of Corneal Cold Storage Media. *Ophthalmology* 2020; 127: 582–588
- Giurgola L, Gatto C, Parel J-M, Miller D, D'Amato Tóthová J. Antimycotic Efficacy and Safety of a New Cold Corneal Storage Medium by Time-Kill and Toxicity Studies. *Cornea* 2019; 38: 1314–1321
- Glöckner A, Cornely OA. *Candida glabrata*—unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. *Mycoses* 2015; 58: 445–450
- Gouba N, Drancourt M. Digestive tract mycobiota: a source of infection. *Med Mal Infect* 2015; 45: 9–16
- Groll A, Buchheidt D, Heinz W, Bellmann R, Cornely OA, Höhl R, Hönigl M, Kluge S, Kurzai O, Lass-Flörl C, Lehrnbecher T, Lichtenstern C, Mendling W, Rath P-M, Rickerts V, Schwartz S, Willinger B, Ruhnke M. 2020. S1 Leitlinie Diagnose und Therapie von *Candida* Infektionen. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-005l_S1_Diagnose-Therapie-Candida-Infektionen_2020-09.pdf (Zugriffsdatum: 14.12.2021)
- Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu Rev Pathol* 2019; 14: 319–338
- Haase G. Antimykotika. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016a: 775–784
- Haase G. Biologie der Pilze. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016b: 609–613
- Haase G. Hefen. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016c: 615–621
- Hariya T, Maruyama K, Sugita S, Takahashi M, Yokokura S, Sato K, Tomaru Y, Shimizu N, Nakazawa T. Multiplex polymerase chain reaction for pathogen detection in donor/recipient corneal transplant tissue and donor storage solution. *Sci Rep* 2017; 7: 5973

Hassan SS, Wilhelmus KR. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 685–690

Haug K, Azqueta A, Johnsen-Soriano S, Shahdadfar A, Drolsum LK, Moe MC, Røger MT, Romero FJ, Collins AR, Nicolaissen B. Donor cornea transfer from Optisol GS to organ culture storage: a two-step procedure to increase donor tissue lifespan. *Acta Ophthalmol* 2013; 91: 219–225

Hermel M, Salla S, Hamsley N, Steinfeld A, Walter P. Detection of contamination during organ culture of the human cornea. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010; 248: 117–126

Hernandez-Camarena JC, Bautista-de Lucio VM, Navas A, Ramirez-Miranda A, Graue-Hernandez EO. Delayed-Onset Post-Keratoplasty Endophthalmitis Caused by Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Case Rep Ophthalmol* 2012; 3: 370–374

Höck M. Dimorphe Pilze. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016: 639–648

Huang L, Zhang YY, Sun LY. Time to positivity of blood culture can predict different *Candida* species instead of pathogen concentration in candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 917–922

Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 336–341

Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002; 40: 87–109

Kato H, Yoshimura Y, Suido Y, Ide K, Sugiyama Y, Matsuno K, Nakajima H. Prevalence of, and risk factors for, hematogenous fungal endophthalmitis in patients with *Candida* bloodstream infection. *Infection* 2018; 46: 635–640

Kercher L, Wardwell SA, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Molecular screening of donor corneas for fungi before excision. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2578–2583

- Keyhani K, Seedor JA, Shah MK, Terraciano AJ, Ritterband DC. The incidence of fungal keratitis and endophthalmitis following penetrating keratoplasty. *Cornea* 2005; 24: 288–291
- Khan Z, Ahmad S, Al-Sweih N, Joseph L, Alfouzan W, Asadzadeh M. Increasing prevalence, molecular characterization and antifungal drug susceptibility of serial *Candida auris* isolates in Kuwait. *PLoS One* 2018; 13: e0195743
- Khodadadi H, Karimi L, Jalalizand N, Adin H, Mirhendi H. Utilization of size polymorphism in ITS1 and ITS2 regions for identification of pathogenic yeast species. *J Med Microbiol* 2017; 66: 126–133
- Kiatos E, Armstrong JJ, Hutnik CM, Tsioros SM, Malvankar-Mehta MS, Hodge WG. The value of corneoscleral rim cultures in keratoplasty: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *ClinicoEconomics Outcomes Res* 2017; 9: 459–474
- Kitzmann AS, Wagoner MD, Syed NA, Goins KM. Donor-related *Candida* keratitis after Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2009; 28: 825–828
- Kloess PM, Stulting RD, Waring GO, Wilson LA. Bacterial and Fungal Endophthalmitis After Penetrating Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 1993; 115: 309–316
- Koenig SB, Wirostko WJ, Fish RI, Covert DJ. *Candida* keratitis after descemet stripping and automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2009; 28: 471–473
- Kordalewska M, Zhao Y, Lockhart SR, Chowdhary A, Berrio I, Perlin DS. Rapid and Accurate Molecular Identification of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogen *Candida auris*. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2445–2452
- Kothe E. Pilze. In: Fuchs G, Hrsg. *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme, 2017: 72–109
- Kowalski RP, Sundar Raj CV, Stuart JC, Dunn DS. Antifungal synergism. A proposed dosage for corneal storage medium. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 250–256
- Kumar K, Askari F, Sahu MS, Kaur R. *Candida glabrata*: A Lot More Than Meets the Eye. *Microorganisms* 2019; 7
- Kumar M, Mugunthan M. Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Med J Armed Forces India* 2018; 74: 333–336

- Kurzai O, Walther G, Cornely OA, Hamprecht A, Lass-Flörl C, Rickerts V, Eckmanns T, Willinger B. 2017. Kurzinformat: Candida auris. <https://www.nrz-myk.de/newsticker/kurzinfo-candida-auris.html> (Zugriffsdatum: 23.10.2020)
- Lackner M, Lass-Flörl C. Commercial Molecular Tests for Fungal Diagnosis from a Practical Point of View. *Methods Mol Biol* 2017; 1508: 85–105
- Lai C-C, Wang C-Y, Liu W-L, Huang Y-T, Hsueh P-R. Time to positivity of blood cultures of different Candida species causing fungaemia. *J Med Microbiol* 2012; 61: 701–704
- Lang GK. Hornhaut (Kornea). In: Lang GK, Hrsg. *Augenheilkunde*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2014: 90–119
- Lanternier F, Lortholary O. Liposomal amphotericin B: what is its role in 2008? *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 Suppl 4: 71–83
- Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 2009; 52: 197–205
- Lass-Flörl C, Mayr A, Perkhofer S, Hinterberger G, Hausdorfer J, Speth C, Fille M. Activities of antifungal agents against yeasts and filamentous fungi: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3637–3641
- Lau N, Hajjar Sesé A, Augustin VA, Kuit G, Wilkins MR, Tourtas T, Kruse FE, Højgaard-Olsen K, Manuel R, Armitage WJ, Larkin DF, Tuft SJ. Fungal infection after endothelial keratoplasty: association with hypothermic corneal storage. *Br J Ophthalmol* 2019; 103: 1487–1490
- Layer N, Cevallos V, Maxwell AJ, Hoover C, Keenan JD, Jeng BH. Efficacy and safety of antifungal additives in Optisol-GS corneal storage medium. *JAMA Ophthalmol* 2014; 132: 832–837
- Leach L, Zhu Y, Chaturvedi S. Development and Validation of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Candida auris from Surveillance Samples. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e01223-17

- Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KH, Jang H-C. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3139–3142
- Ling MLH, Wells M, Petsoglou C, Luo K, Georges P, Devasahayam R, Hodge C, Treloggen J, Sutton G, Zhu M. Factors Affecting Corneal Organ Culture Contamination: A 6-year Study at the New South Wales Tissue Bank. *Cornea* 2019; 38: 829–835
- Linke SJ, Fricke OH, Eddy M-T, Bednarz J, Druchkiv V, Kaulfers P-M, Wulff B, Püschel K, Richard G, Hellwinkel OJC. Risk factors for donor cornea contamination: retrospective analysis of 4546 procured corneas in a single eye bank. *Cornea* 2013; 32: 141–148
- Liu XP, Fan SR, Peng YT, Zhang HP. Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. *J Mycol Med* 2014; 24: 106–111
- Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3311–3312
- Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med* 2014; 40: 1303–1312
- Mahmoudi S, Masoomi A, Ahmadikia K, Tabatabaei SA, Soleimani M, Rezaie S, Ghahvechian H, Banafsheafshan A. Fungal keratitis: An overview of clinical and laboratory aspects. *Mycoses* 2018; 61: 916–930
- Maier P, Reinhard T, Cursiefen C. Descemet stripping endothelial keratoplasty—rapid recovery of visual acuity. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110: 365–371
- Mazoteras P, Bispo PJM, Höfling-Lima AL, Casaroli-Marano RP. DNA extraction methods for panbacterial and panfungal PCR detection in intraocular fluids. *Curr Eye Res* 2015; 40: 697–706
- Merchant A, Zacks CM, Wilhelmus K, Durand M, Dohlman CH. Candidal endophthalmitis after keratoplasty. *Cornea* 2001; 20: 226–229

- Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Webb CH, Elbaz W, McMullan R. Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR. *J Med Microbiol* 2008; 57: 296–303
- Mistò R, Giurgola L, Pateri F, Frigerio E, Limongelli A, D'Amato Tóthová J. Method for sterility testing of corneal storage and transport media after removal of interfering antimicrobials: prospective validation study in compliance with the European Pharmacopoeia. *BMJ Open Ophthalmol* 2017; 2: e000093
- Montagna MT, Lovero G, Coretti C, Giglio O de, Martinelli D, Bedini A, Delia M, Rosato A, Codeluppi M, Caggiano G. In vitro activities of amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B against 604 clinical yeast isolates. *J Med Microbiol* 2014; 63: 1638–1643
- Nationales Refernzzentrum für Invasive Pilzinfektionen. 2020. Invasive Mykosen. <https://www.nrz-myk.de/invasive-mykosen.html> (Zugriffsdatum: 23.10.2020)
- Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol* 2015; 69: 71–92
- Ortiz-Gomariz A, Higuera-Esteban A, Gutiérrez-Ortega ÁR, González-Méijome JM, Arance-Gil A, Villa-Collar C. Late-onset *Candida* keratitis after Descemet stripping automated endothelial keratoplasty: clinical and confocal microscopic report. *Eur J Ophthalmol* 2011; 21: 498–502
- Palka-Santini M, Cleven BE, Eichinger L, Krönke M, Krut O. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiol* 2009; 9: 1
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 62: e1-50
- Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 18026

Parekh M, Borroni D, Romano V, Kaye SB, Camposampiero D, Ponzin D, Ferrari S. Next-generation sequencing for the detection of microorganisms present in human donor corneal preservation medium. *BMJ Open Ophthalmol* 2019; 4: e000246

Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *Int Ophthalmol* 2008; 28: 155–163

Pels E, Rijneveld WJ. Organ culture preservation for corneal tissue. Technical and quality aspects. *Dev Ophthalmol* 2009; 43: 31–46

Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of anti-fungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: e383-e392

Perry I, Peterson K, Tóthová JD, Tramber M, Botsay S, Tremblay D. Performance of New Hypothermic Corneal Storage Media With an Antimycotic Tablet in Comparison to Traditional Hypothermic Media During Simulated Eye Bank Processing. *Cornea* 2020; 39: 1031–1039

Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1199–1203

Plantamura E, Huyghe G, Panterne B, Delesalle N, Thépot A, Reverdy ME, Damour O, Auxenfans C. Validation of the BacT/ALERT®3D automated culture system for the detection of microbial contamination of epithelial cell culture medium. *Cell Tissue Bank* 2012; 13: 453–459

Qiao GL, Ling J, Wong T, Yeung SN, Iovieno A. *Candida* Keratitis: Epidemiology, Management, and Clinical Outcomes. *Cornea* 2020; 39: 801–805

Ritterband DC, Shah MK, Meskin SW, Seedor JA, Koplín RS, Perez W, Yang R, Hu DN, Dahl P. Efficacy and safety of voriconazole as an additive in Optisol GS: a preservation medium for corneal donor tissue. *Cornea* 2007; 26: 343–347

RKI Kommission Umweltmedizin. Empfehlung des Robert Koch-Instituts. Pathogenetische Bedeutung der intestinalen Candidabesiedelung. Mitteilung der Kommission

„Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“ des Robert Koch-Instituts. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2004; 47: 587–600

Röck D, Wude J, Bartz-Schmidt KU, Yoeruek E, Thaler S, Röck T. Factors influencing the contamination rate of human organ-cultured corneas. Acta Ophthalmol 2017; 95: e706–e712

Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33: 673–688

Romanelli AM, Fu J, Herrera ML, Wickes BL. A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. Mycoses 2014; 57: 612–622

Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. Curr Drug Targets 2006; 7: 495–504

Sahay P, Maharana PK. Increasing Povidone-Iodine Exposure in Endothelial Keratoplasty Tissue Processing and Fungal Infection Impact. Cornea 2019; 38: e50

Salisbury CD, Kirk CN, Lee WB, Hamilton SM, Kozarsky AM, Meinecke E, Stulting RD. Increasing Povidone-Iodine Exposure in Endothelial Keratoplasty Tissue Processing and Fungal Infection Impact. Cornea 2019; 38: 1093–1096

Sallam A, Lynn W, McCluskey P, Lightman S. Endogenous *Candida* endophthalmitis. Expert Rev Anti Infect Ther 2006; 4: 675–685

Samaranayake LP, K. Cheung L, Samaranayake YH. Candidiasis and other fungal diseases of the mouth. Dermatol Ther 2002; 15: 251–269

Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses 2015; 58 Suppl 2: 2–13

Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. Microbiol Immunol 2009; 53: 41–44

Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, Ryan L, Shackleton J, Trimlett R, Meis JF, Armstrong-James D, Fisher MC. First hospital outbreak of the

globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016; 5: 35

Schroeter J, Wilkemeyer I, Schiller RA, Pruss A. Validation of the Microbiological Testing of Tissue Preparations Using the BACTEC™ Blood Culture System. *Transfus Med Hemother* 2012; 39: 387–390

Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the Gut: From Commensals to Infectious Agents. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 837–842

Segal E, Romano A, Eylan E, Stein R. Fungal flora of the normal conjunctival sac. *Mykosen* 1977; 20: 9–14

Seiler TG, Tschopp M, Zimmerli S, Tappeiner C, Wittwer VV, Frueh BE. Time Course of Antibiotic and Antifungal Concentrations in Corneal Organ Culture. *Cornea* 2016; 35: 127–131

Seitz B, Blüthner K, Kruse FE, Reinhard T, Sundmacher R. Hornhauttransplantation: Zu geringe Spendenbereitschaft. *Dtsch Arztebl* 2004; 101: A 3326–3330

Sekundo W. Hornhaut. In: Augustin AJ, Hrsg. *Augenheilkunde*. Berlin: Springer, 2007: 229–259

Serna-Ojeda JC, Pedro-Aguilar L, Rodriguez-Quintanilla C, Mejía-López H, Ponce-Angulo DG, Navas A, Bautista-de Lucio VM, Graue-Hernandez EO. Post-keratoplasty Endophthalmitis by Multidrug-resistant *Pseudomonas Aeruginosa* With Positive Culture of the Contralateral Donor Cornea: A Case Report. *Transplant Proc* 2018; 50: 964–966

Shenoy V, Ballenberger M, Prince A, Maslak S. Panophthalmitis From *Candida auris*. *Ann Intern Med* 2019; 171: 941–943

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36: 288–305

Skenderi Z, Giurgola L, Gatto C, D'Amato Tóthová J, Pruß A, Schroeter J. Increased sensitivity of microbiological testing of cornea organ culture medium by additional resin treatment. *BMJ Open Ophthalmol* 2018; 3: e000173

Srinivasan M. Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15: 321–327

Sutphin JE, Pfaller MA, Hollis RJ, Wagoner MD. Donor-to-host transmission of *Candida albicans* after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 2002; 134: 120–121

Thareja T, Kowalski R, Kamyar R, Dhaliwal D, Jeng BH, Tu E, Jhanji V. Fungal infection after keratoplasty and the role of antifungal supplementation to storage solution: a review. *Br J Ophthalmol* 2019

Thomas PA, Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 210–220

Thuret G, Carricajo A, Chiquet C, Vautrin AC, Celle N, Boureille M, Acquart S, Aubert G, Maugery J, Gain P. Sensitivity and rapidity of blood culture bottles in the detection of cornea organ culture media contamination by bacteria and fungi. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 1422–1427

Thuret G, Carricajo A, Vautrin AC, Raberin H, Acquart S, Garraud O, Gain P, Aubert G. Efficiency of blood culture bottles for the fungal sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 586–590

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 317–322

Tran D, Dhaliwal D, Kamyar R, Jhanji V, Kowalski RP. Effect of Optisol Supplementation With 0.255 µg/mL Amphotericin B on Elimination of Yeast at 5°C. *Cornea* 2019; 38: 901–904

Tran KD, Aldrich BT, D'Amato Tóthová J, Skeie JM, Kondratick CM, Giurgola L, Gatto C, Reed CR, Schmidt GA, Terry MA, Greiner MA. Efficacy and Safety of Various Amphotericin B Concentrations on *Candida albicans* in Cold Storage Conditions. *Cornea* 2020; 39: 110–117

Tsay S, Welsh RM, Adams EH, Chow NA, Gade L, Berkow EL, Poirot E, Lutterloh E, Quinn M, Chaturvedi S, Kerins J, Black SR, Kemble SK, Barrett PM, Barton K, Shannon DJ, Bradley K, Lockhart SR, Litvintseva AP, Moulton-Meissner H, Shugart A, Kallen A, Vallabhaneni S, Chiller TM, Jackson BR. Notes from the Field: Ongoing Transmission of

Candida auris in Health Care Facilities - United States, June 2016-May 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 66: 514–515

Tsui E, Fogel E, Hansen K, Talbot EA, Tammer R, Fogel J, Daly ER, Noble J, Caine L, Zegans ME. Candida Interface Infections After Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2016; 35: 456–464

Vignola R, Mistò R, Giurgola L, Pateri F, Pocobelli A, D'Amato Tóthová J. A two-centre validation study of sterility test of corneal storage media with elimination of interfering antimicrobials in compliance with the European Pharmacopoeia. *Cell Tissue Bank* 2019; 20: 275–285

Villalba M, Linares-Sicilia MJ, González-Andrades M, Eisman M, Giménez-Almenara J, Arias M, Villalba R. In vitro susceptibility of microorganisms isolated from cold stored corneas: increased gentamicin-resistance in cornea banking. *Cell Tissue Bank* 2020; 21: 159–165

Villarrubia A, Cano-Ortiz A. Candida keratitis after Descemet stripping with automated endothelial keratoplasty. *Eur J Ophthalmol* 2014; 24: 964–967

Vislisel JM, Goins KM, Wagoner MD, Schmidt GA, Aldrich BT, Skeie JM, Reed CR, Zimmerman MB, Greiner MA. Incidence and Outcomes of Positive Donor Corneoscleral Rim Fungal Cultures after Keratoplasty. *Ophthalmology* 2017; 124: 36–42

Wade RL, Chaudhari P, Natoli JL, Taylor RJ, Nathanson BH, Horn DL. Nephrotoxicity and other adverse events among inpatients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76: 361–367

Webster CE, Odds FC. Growth of pathogenic Candida isolates anaerobically and under elevated concentrations of CO₂ in air. *Med Mycol* 1987; 25: 47–53

Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, Litvintseva AP. Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2996–3005

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Sninsky JJ, Gelfand, David H. , White, Thomas J., Innis MA, Hrsg. *PCR Protocols*: Elsevier, 1990: 315–322

Wilhelmus KR, Hassan SS. The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation. *Ophthalmology* 2007; 114: 440–445

Willinger B. Moderne Pilzdiagnostik. *Wien klin Mag* 2019; 22: 204–209

Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 43: 78–81

WMA-Generalversammlung. 1964. WMA Deklaration von Helsinki- Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen. https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/International/Deklaration_von_Helsinki_2013_20190905.pdf (Zugriffsdatum: 19.11.2020)

Yamazoe K, Den S, Yamaguchi T, Tanaka Y, Shimazaki J. Severe donor-related *Candida* keratitis after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011; 249: 1579–1582

Zanetti E, Bruni A, Mucignat G, Camposampiero D, Frigo AC, Ponzin D. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea* 2005; 24: 603–607

10 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Einladung, für die experimentelle Arbeit aus Bonn an das Paul-Ehrlich-Institut zu kommen. Ohne ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und in allen Phasen ihrer Entstehung mit Interesse, Fachwissen und Ratschlägen zu begleiten, wäre die Durchführung nicht möglich gewesen. In ihrer Abteilung für Mikrobiologie am PEI durfte ich unter hervorragender Betreuung die für diese Arbeit notwendigen Versuche durchführen und gleichzeitig Einblicke in aktuelle Forschungsbereiche und die Aufgaben des PEI gewinnen. Für diese bereichernde Zeit bin ich sehr dankbar.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mikrobiologische Sicherheit für ihre freundliche Aufnahme während meines Aufenthaltes am PEI und für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Versuche. Insbesondere möchte ich Dr. Birgit Blissenbach danken, die mich bei dieser Arbeit umfassend und auch über die Laborphase hinaus betreut hat und für alle Fragen stets ansprechbar war. Dr. Oleg Krut danke ich ebenfalls für die Begleitung meiner Arbeit, besonders für das Einbringen seiner Expertise in regulatorischen Fragen sowie bei der Aufbereitung der Daten meiner Sequenzierungsversuche. Anja Schneider und Marie Anders-Maurer danke ich herzlich für die Anleitung und Hilfe bei praktischen Fragen im Labor.

Ein abschließender Dank gilt dem Nationalen Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen für die Bereitstellung verschiedener Pilzisolat, der Hornhautbank der Charité Berlin für das Zusenden von klinischen Proben verworfener Korneatransplantate sowie dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.