

Aus der Augenklinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand der Augenklinik: Prof. Dr. A. Kampik

**Virulenz und Resistenzspektrum von *Staphylococcus epidermidis* im  
experimentellen Modell der Endophthalmitis**

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

vorgelegt von

Angela Höpfner  
aus Braunschweig  
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Kampik
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Aepfelbacher Prof. Dr. B. H. Belohradsky Prof. Dr. H. Ostermann
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. H. Miño de Kaspar
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	10.10.2002

## Inhaltsverzeichnis

<b>A.</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>A.1.</b>	<b>Endophthalmitis</b>	3
A.1.1.	Definition	3
A.1.2.	Weiterführende Diagnostik, Symptome und klinische Zeichen	3
A.1.3.	Elektrophysiologie	5
A.1.4.	Histopathologie	6
A.1.5.	Ätiologie	7
A.1.6.	Prävention, Prognose und Komplikationen	9
A.1.7.	Differentialdiagnose	10
A.1.8.	Therapeutische Überlegungen	10
<b>A.2.</b>	<b><i>Staphylococcus epidermidis</i> und die anderen koagulasnegativen Staphylokokken</b>	12
A.2.1.	Die Gattung <i>Staphylococcus</i>	12
A.2.2.	Koagulasnegative Staphylokokken - Allgemeiner Überblick	13
A.2.3.	Definition der Antibiotikaresistenz	14
A.2.4.	Antibiotikaresistenz der koagulasnegativen Staphylokokken	16
<b>A.3.</b>	<b>Ziele der Studie</b>	19
<b>B.</b>	<b>Material und Methoden</b>	20
B.1.	Charakterisierung der Bakterienstämme	20
B.2.	Versuchstiere	21
B.3.	Mikrobiologische Technik - Herstellung einer Bakteriensuspension definierter Erregerkonzentration und Resistenzbestimmung	22
B.4.	Inokulation der Bakterien und experimentelle Gruppen	23
B.5.	Klinische Untersuchung und Dokumentation des Verlaufs	23
B.6.	Elektrophysiologischer Versuchsaufbau	24
B.7.	Enukleation der Bulbi und Qualitätskontrolle	25
B.8.	Histopathologische Beurteilung	25
<b>C.</b>	<b>Ergebnisse</b>	28
C.1.	Ergebnisse der klinischen Untersuchung	28
C.2.	Funktionelle Ergebnisse (Elektroretinogramm)	31
C.3.	Beurteilung der Glaskörperkulturen	34
C.4.	Ergebnisse der histopathologischen Analyse	35
<b>D.</b>	<b>Diskussion</b>	40

<b>E.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	47
<b>F.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	49
<b>G.</b>	<b>Danksagung</b>	54
<b>H.</b>	<b>Lebenslauf</b>	55

## A. Einleitung

Die postoperative Endophthalmitis ist eine seltene, dafür eine der schwerwiegendsten Komplikationen nach intraokularen Eingriffen (Speaker und Menikoff, 1993).

Die Inzidenz nach Kataraktchirurgie liegt bei ungefähr 0,07 % (Kattan et al., 1991; Aaberg et al., 1998). Insgesamt bewegt sich die Inzidenz postoperativ zwischen 0,05 % für die pars plana Vitrektomie und 0,37 % nach Sekundäreingriffen mit Linsenersatz (Aaberg et al., 1998). Trotz jüngster Fortschritte in der Therapie der postoperativen Endophthalmitis hinsichtlich potenter Antibiotika und mikrochirurgischer Techniken bleibt die Prognose ernst (Somani et al., 1997). Der Median der Sehschärfe beträgt 20/200 trotz aggressiver konservativer und chirurgischer Therapie (Aaberg et al., 1998), und nur ungefähr ein Drittel der Patienten erreicht einen Visus besser als 20/40 oder noch höher (Somani et al., 1997; Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1995).

Grampositive Staphylokokken gelten als Erreger in beinahe 94 % der Fälle postoperativer Endophthalmitis. *Staphylococcus epidermidis* ist der bei weitem am häufigsten nachgewiesene Keim (70 %), gefolgt von *Staphylococcus aureus* (10 %), und Enterokokken (2 %) (Johnson et al., 1997; Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1996; Han et al., 1996; O'Day et al., 1982; Archer, 1990; Mao et al., 1993). Als Hauptursache für die intraokulare Infektion wird die patienteneigene normale Haut- und Konjunktivalflora angesehen (Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1996; Speaker et al., 1991; Heaven et al., 1992). Zu den Schlüsselfaktoren für einen günstigen Visusverlauf gehören eine frühzeitige Diagnose und unverzüglicher Behandlungsbeginn der Endophthalmitis sowie eine schnelle, zuverlässige Keimidentifizierung mit Identifikation des entsprechenden Antibiotikaresistenzspektrums (Miño de Kaspar et al., 1993; Klauss et al., 1998; Kampik und Heidenkummer, 1994).

Eine Arbeitsgruppe an der Augenklinik der Universität München beschäftigt sich mit der Klinik, der Bakteriologie und Mykologie, der Prävention und der Wirksamkeit verschiedener Therapieformen bei der Endophthalmitis. In der Augenklinik der Universität München werden jährlich ungefähr 20 Endophthalmitispatienten behandelt, die überwiegend von extern eingewiesen werden. Grasbon et al. untersuchten 1995 die koagulasenegative Staphylokokken auf der blassen und chronisch entzündeten Bindehaut. Über alle durchgeführten Abstriche erreichten koagulasenegative Staphylokokken 86 % Prävalenz. Bei bis zu 30 % der Abstriche von der normalen Bindehautflora zeigten sich *Staphylococcus epidermidis*-Stämme, die empfindlich für alle getesteten Antibiotikagruppen waren. Getestet wurden Penicilline, Cephalosporine, Gyrasehemmer, Makrolide, Aminoglykoside sowie Vancomycin und Chloramphenicol.

Dagegen zeigten sich im Rahmen der mikrobiologischen Diagnostik alle aus den Glaskörperaspiraten von Endophthalmitis-Patienten isolierten *Staphylococcus epidermidis*-Stämme gegen mindestens ein getestetes Antibiotikum resistent, wobei die verantwortlichen Keime entweder partiell- oder multiresistent waren. Als partiellresistent wurden die Keime charakterisiert, die sich gegen ein bis drei der getesteten Antibiotika

resistent zeigten. Antibiotisch multiresistent bedeutete per definitionem Resistenz mindestens gegen Meticillin oder andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Noch nie konnte an der Augenklinik der Universität München ein für alle getesteten Antibiotika empfindlicher *Staphylococcus epidermidis*-Stamm aus Glaskörperaspiraten von Endophthalmitis-Patienten isoliert werden. Aufgrund dieser Beobachtung wurde diese Studie durchgeführt. Bisher existieren in der Literatur noch keine Daten über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Antibiotikaresistenzspektrum des verantwortlichen *Staphylococcus epidermidis*-Stammes und dem klinischen Verlauf der Krankheit. Koagulasenegative Staphylokokken zeigen eine zunehmende Resistenzhäufigkeit gegen multiple Antibiotika (Huebner und Goldmann, 1999), und es wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese resistenten Bakterienstämme noch unbekannte genetische Faktoren besitzen, die für deren Pathogenität verantwortlich sind.

## **A.1. Endophthalmitis**

### **A.1.1. Definition**

Die Endophthalmitis stellt eine Entzündung der intraokularen Gewebe und Flüssigkeiten ohne Sklerabeteiligung dar (Hassan et al., 1992), wobei zwischen einer exogenen und einer endogenen Infektion unterschieden wird. Bei der exogenen Endophthalmitis gelangen die Erreger intra- oder postoperativ, durch Trauma oder aber von Entzündungsherden der Augenadnexe nach intraokular. Bei einer endogenen Infektion gelangen die Keime metastatisch auf dem Blutweg in das Auge.

### **A.1.2. Weiterführende Diagnostik, Symptome und klinische Zeichen**

In den meisten Fällen einer akuten postoperativen Endophthalmitis treten die klinischen Symptome plötzlich auf und schreiten schnell voran. Sie manifestieren sich 2–4 Tage nach einem intraoperativen Eintritt der Erreger (Sunaric-Mégevand und Pournaras, 1997). An subjektiven Beschwerden bemerkt der Patient einen Schmerz, der spezifisch im Auge lokalisiert werden kann, aber auch diffus den Kopf betreffen kann, Druckgefühl, Visusverlust, Brennen, Tränen, Rötung und Photophobie (Klauss et al., 1998).

An der Spaltlampe zeigen sich typischerweise Lidödem, Hyperämie der Konjunktiva und Chemosis, Hornhautödem bis hin zu einem Cornealring/Abszeß, sowie ein Reizzustand der Vorderkammer mit Zellen und positivem Tyndall-Phänomen. Oftmals bildet sich ein Hypopyon durch Sedimentation von Entzündungszellen in der peripheren Vorderkammer wie auch im Kapselsack hinter der Kunstlinse aus, welches besonders charakteristisch für eine exogene Endophthalmitis ist (Wilson, 1987). Eine positive Fibrinreaktion in der Vorderkammer bestätigt oft zusätzlich die Infektion. Der Augendruck bleibt oftmals zunächst im Normbereich. Später kann die Infektion zu einem postentzündlichen Sekundärglaukom führen. Je nach Virulenz des Erregers zeigt sich ein Krankheitsbild unterschiedlichen Schweregrades. Wichtig nach Kataraktchirurgie ist die Beurteilung des Skleratunnels hinsichtlich eventueller Wundkomplikationen. Funduskopisch zeigt sich eine zunehmende Eintrübung des Glaskörpers (Opakifikation) in Form einer zelligen Infiltration. Je nachdem, inwieweit Vorderkammer und Glaskörper durch Zell- und Fibrinansammlungen eingetrübt sind, läßt sich der rote Augenhintergrundreflex bis zu einem bestimmten Grad darstellen (Brod und Flynn Jr, 1997). Im Endstadium geht dieser vollständig verloren. Im Ultraschall-B-Bild sind die Infiltrate als multiple kleine Verdichtungen hoher Mobilität darstellbar, im A-Bild zeigen sich multiple Echos niedriger bis mittlerer Reflektivität durch die rasche Entwicklung von Membranen (Burk, 1999). Zudem läßt sich eine Verdickung der retinochorioidalen Schicht aufzeigen. Die Netzhaut

zeigt eine Perivaskulitis bzw. retinale Begleitvaskulitis, intraretinale Blutungen bis hin zu Netzhaut- und Aderhautamotio, welche meist nur noch ultrasonographisch festzustellen sind. Eine Endophthalmitis wird solange als „mild“ bezeichnet, solange Fundusdetails erkennbar sind und die Sehschärfe über Handbewegungen hinausgeht (Kampik und Heidenkummer, 1994).

Die Bestimmung der verursachenden Organismen aus dem Kammerwasser und dem Glaskörper festigt die Diagnose. Die Kultivierbarkeit eines Keimes ist artspezifisch, hängt jedoch auch von der absoluten Keimzahl, der Vorschädigung des Keims, sowie von eventuell vorhandenen Wachstumshemmenden Faktoren ab (Lohmann et al., 1997). Kulturen sollten sowohl aus Kammerwasser als auch aus dem Glaskörper erfolgen. Letzterer ist mit einem höheren Anteil positiver Ergebnisse assoziiert. Die besten Ergebnisse werden mit Vitrektomiematerial erzielt, wobei ein Keimnachweis bis 83 % erreicht wird. Aber auch die intraoperative Gramfärbung und Mikroskopie ist in 54 % positiv (Klauss et al., 1998). Miño de Kaspar et al. postulierten 1993, daß mit der direkten Mikroskopie innerhalb von 10 Minuten bis 2 Stunden ein Erregernachweis mit vorläufiger Klassifizierung und Therapieempfehlung erreicht werden kann. Das zu kultivierende Material sollte möglichst direkt auf geeignete Nährmedien gegeben werden. Unbedingt Verwendung finden sollten Hemoline-aerobe-Bouillon (Blutkulturmedium), Hemoline-anaerobe-Bouillon (Blutkulturmedium), Kochblutagar, Frischblutagar und Sabouraud-Bouillon (Blutkulturmedium) (Miño de Kaspar et al., 1993). In der Augenklinik der LMU München wird die Resistenzbestimmung nach der Methode von Kirby-Bauer et al. (1966) für folgende Antibiotika durchgeführt:

Penicilline: Penicillin G, Amoxicillin, Ampicillin, Oxacillin, Carbenicillin

Cephalosporine: Cefalotin, Cefalexin, Cefoxitin, Cefotaxim, Ceftazidim

Gyrasehemmer: Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin

Makrolide: Clindamycin, Erythromycin und Lincomycin

Aminoglykoside: Gentamicin, Kanamycin, Tobramycin, Neomycin

sowie für Imipenem, Poymyxin B, Vancomycin, Chloramphenicol und Tetracyclin.

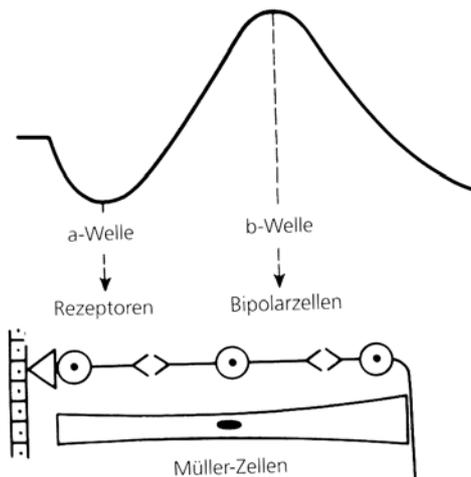
Antibiogramme erstellt mit direktem Agardiffusionstest mittels direkter Inokulation intraokulärer Proben von Patienten mit akuter Endophthalmitis zeigen eine hohe Übereinstimmung mit der konventionellen Standardmethode nach Kirby-Bauer, vorausgesetzt genügend Material ist gewinnbar. Im Falle von Resistenzen können auch sehr kleine Keimzahlen nützliche Informationen geben. Obwohl zur Bestätigung immer eine konventionelle Resistenzbestimmung durchgeführt werden sollte, liefert die direkte Methode früher, innerhalb von 6 bis 10 Stunden, Informationen über Antibiotika-Resistenzen, ein Zeitraum, der potentiell Sehvermögen erhaltend sein kann. Die Methode eignet sich besonders für Fälle einer akuten Endophthalmitis, in denen aerobe/mikroaerobe Bakterien als potentiell pathogene Keime in Betracht gezogen werden müssen. Dies ist der Fall, wenn klinische Zeichen sehr schnell, ungefähr 18 Stunden nach potentieller Infektion, erscheinen (Miño de Kaspar et al., 2002).

### A.1.3. Elektrophysiologie

In den Photorezeptoren führt die Absorption von Lichtquanten zu einer Hyperpolarisierung des Membranpotentials. Durch synaptische Kontakte kommt es in der mittleren Netzhaut zu Änderungen des phasischen Membranpotentials, die Summation der lichtreizabhängigen neuronalen Aktivität kann aufgrund der Potentialübertragung von der Hornhaut abgeleitet werden. Diese Potentialschwankungen werden über eine differente corneale Elektrode gegenüber einer indifferenten Hautelektrode und einer Referenzelektrode am Ohr abgeleitet, verstärkt und in einem Rechner aufsummiert, um so zufällige Störpotentiale zu unterdrücken.

Je nach Blitzintensität und Adaptationszustand erhält man standardisierte Antworten, die das photopische System, das den zentralen Fundus und die Mehrheit der Zapfen repräsentiert bzw. das skotopische System, die Reaktion der Stäbchen auf Lichtreize, der Netzhaut darstellen. Die normale ERG-Antwort ist biphasisch und besteht aus einer initial negativen Ablenkung, der a-Welle, die der Summe der Photorezeptoren entspricht und der nachfolgenden positiven b-Welle, die aus der postsynaptischen neuronalen Aktivität besteht. Die b-Welle wird überwiegend im Bereich der inneren Körnerschicht, der Bipolarzellregion generiert, die Aktivität der Müller-Zellen trägt wesentlich zu ihrem Verlauf bei, nicht jedoch die Schicht der Ganglienzellen. Die b-Welle setzt sich aus b1- und b2-Unterkomponenten zusammen, wobei erstere sowohl Stäbchen als auch Zapfenaktivität repräsentiert, während letztere Zapfenaktivität darstellt. Die genaue Zuordnung ist noch nicht vollständig geklärt. Die Amplitude der b-Welle nimmt sowohl mit Dunkeladaptation als auch mit einem verstärkten Lichtstimulus zu.

Die verschiedenen Reizbedingungen werden aufgrund der unterschiedlichen Rezeptorphysiologie ausgewählt. Stäbchen werden schon bei niedriger Leuchtdichte, entsprechend den niedrigen dunkeladaptierten Leuchtdichten, erregt, haben jedoch eine lange Latenz- und Gipfelzeit. Die dunkeladaptierten Ableitungen mit höherer Leuchtdichte sind gemeinsame Stäbchen-Zapfen-Antworten. Bei den helladaptierten Ableitungen werden die Stäbchen durch die Umfeldhelligkeit ausgeblendet (Bornfeld und Wessing, 1992; Kanski, 1996).



**Abbildung 1:** Normales Licht-ERG und Ort der Entstehung (aus Kanski, 1996).

Im Verlauf der bakteriellen Endophthalmitis, posttraumatisch oder postoperativ bedingt, kommt es zu einer zunehmenden Eintrübung der intraokulären Medien mit einer raschen Sehverschlechterung. Da das Licht-ERG auch bei Medientrübungen noch ableitbar ist, kann man es zur Prognose vor operativen Eingriffen, z.B. der Vitrektomie, einsetzen.

Anhand des ERG läßt sich der Schädigungsgrad der Retina, z.B. massives präretinales Exsudat oder retinale Ablösung, durch Erlöschen des Elektretinogramms feststellen. Das Licht-ERG sollte immer mit einem Blitz-VEP und einer Ultraschalluntersuchung kombiniert werden, um eine genaue Information über Struktur und Funktion der Netzhaut bei Medientrübungen zu bekommen.

Besonders im frühen Stadium der bakteriellen Endophthalmitis ist der Entzündungsprozess vornehmlich in Netzhaut, retinalen Gefäßen und an der Glaskörperbasis lokalisiert. Dies macht die elektrophysiologische Untersuchung unbedingt notwendig. Pathologische Veränderungen erlauben den Rückschluß auf Art und Lage des Prozesses und ermöglichen die frühe Erfassung auch bei klinisch noch nicht sichtbaren Befunden (Kriegelstein, 1999). Auch mögliche negative Folgen für die Netzhaut aufgrund einer Antibiotika- oder Kortikoidtherapie lassen sich durch das Elektretinogramm beurteilen (Zemel et al., 1995; Loewenstein et al., 1991; Moschos et al., 1990).

#### **A.1.4. Histopathologie**

Bei einer bakteriellen Endophthalmitis kommt es zu einer allmählichen Zerstörung des Gewebes durch Entzündungszellen, vornehmlich nekrotisierende Leukozyten und mononukleäre Zellen. Diese gelangen hauptsächlich über Netzhautgefäße und über das Kapillarnetz von Iris und Ziliarkörper in das Augeninnere. In der Vorderkammer können

polymorphkernige Leukozyten akkumulieren bis hin zu einem Hypopyon und es kommt zu einer Infiltration des Trabekelnetzwerkes, was allmählich zu einer Verstopfung des Schlemm'schen Kanals führt.

Die Freisetzung vasoaktiver Substanzen verursacht eine zunehmende Neovaskularisation und die Entstehung von Granulationsgewebe. Das ödematöse Irisstroma ist vollgepackt mit Lymphozyten und Plasmazellen, was zu einer völligen Zerstörung des Pigmentepithels führen kann. Die Entzündungszellen stimulieren die pigmentierten und nicht pigmentierten Schichten der pars plana des Ziliarkörpers zur Proliferation, was die Ausbildung einer Glaskörpermembran induziert, die auch als cyclische Membran bezeichnet wird.

Die Linse zeigt sekundäre degenerative Veränderungen des Cortex und wird bei Intaktheit der Linsenkapsel nicht von Entzündungszellen infiltriert. Bei Kapselruptur kommt es antigenvermittelt zur Komplexbildung im Rahmen einer Immunreaktion und zu einer massiven granulomatösen Zellreaktion. Entzündungsmediatoren bewirken eine erhöhte Kapillarpermeabilität der retinalen Gefäße und damit den Austritt von Plasma, roten Blutkörperchen und Fibrin. In der äußeren plexiformen Schicht kann es zu zystischen Veränderungen kommen.

Bei Auftreten eines Glaskörperabszesses durch die Ansammlung von Entzündungszellen besteht die Gefahr einer Netzhautablösung. Von nekrotisierenden Leukozyten freigesetzte autolytische Enzyme können schon in frühen Stadien zur Auflösung der inneren retinalen Schichten führen. Oft greift die Entzündung auch auf die Aderhaut über, seltener ist der Sehnerv mitbetroffen (Lee, 1993; Newell, 1992).

### **A.1.5. Ätiologie**

Die Endophthalmitis kann nach jedem intraokulären chirurgischen Eingriff auftreten, am häufigsten nach Kataraktchirurgie, was auf die hohe Anzahl intraokularer Operationen zurückzuführen ist. Seltener nach Filterkissen-, Cerclage-, und Plombeninfektion.

Hierbei gelangen resistente Keime intraoperativ, häufig *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* und *Pseudomonas*, aus dem Bindehautsack ins Augeninnere. Auch postoperativ, vor allem bei insuffizienten Wundverhältnissen nach operativer Revision, z.B. Wunddehiszenz mit inkarzerierten Iris-oder Glaskörperanteilen (Özer-Arasli et al., 1997), können die pathogenen Keime nach intraokular penetrieren und innerhalb kürzester Zeit zum Verlust der Bulbusintegrität führen. Da die heutigen Methoden der Sterilisation und Asepsis in der intraokularen Chirurgie sterile Operationsbedingungen gewährleisten, wird die Infektion durch die bakterielle Flora des Patientenauges als Hauptursache der postoperativen Endophthalmitis angesehen (Miño de Kaspar et al., 2000). Insbesondere Augenlider, Konjunktiva und Tränenwege stellen potentielle Keimreservoirs dar. Lider und Bindehaut von Patienten, die zur Kataraktoperation anstehen, sind in hohem Maße (86 %) von Mikroben besiedelt (Breitbach und Spitznas, 1991).

Zu den selteneren Infektionsquellen gehören kontaminierte Umgebungsflora, Spülflüssigkeiten, Instrumente und Implantate (Speaker et al., 1991, Bannermann et al., 1997). Nach verschiedenen Studien tritt eine Endophthalmitis nach etwa 2-7 % aller perforierenden Traumata auf, als klassischer Erreger ist *Bacillus cereus* zu nennen (Schmidseder, 1998). Zudem wurden Fälle von Endophthalmitis nach Perforation bei refraktiver Hornhautchirurgie, sowie endogen, durch metastatische Streuung der Keime im Rahmen einer Immunsuppression, z.B. bei Diabetes mellitus, beschrieben. Hauptvertreter im Erregerspektrum sind Streptokokken, zunehmend auch Pilze, zu den häufigsten Infektionsquellen gehören Endokarditis und Gastrointestinaltrakt (Okada et al., 1993). Grundsätzlich kann sich jeder bakterielle Keim als pathogen erweisen.

### A.1.6. Prävention, Prognose und Komplikationen

Die Prävention der bakteriellen Endophthalmitis durch präoperative Maßnahmen spielt eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Inzidenz und des Funktionserhaltes der betroffenen Augen.

Prädisponierende Faktoren wie Blepharitis, Konjunktivitis oder erhöhte Keimbelastungen der Tränenwege sollten präoperativ erkannt und saniert werden. Auch Neurodermitiker gehören zu den besonders gefährdeten Patienten, da die Bindehaut häufiger mit resistenten pathogenen Keimen, zumeist Staphylokokken, besiedelt ist. Bei Risikopatienten mit chronischer Blepharokonjunktivitis sollte ein Bindehautabstrich zur Erregerisolierung und Resistenzprüfung vorgenommen werden (Grasbon et al., 1995) und eine prophylaktische Applikation topischer Antibiotika, z.B. Gentamicin alle 10 Minuten eine Stunde vor dem Eingriff ist anzuraten. Wichtig ist auch die Beachtung der Kontaklinienhygiene.

Prä- und postoperativ bewirkt ein Ausspülen des Konjunktivalsackes mit Polyvidon-Jod 5% eine deutliche Keimreduktion (Binder et al., 1998). Zu den Maßnahmen bei der Prophylaxe postoperativer Endophthalmitiden gehören natürlich auch die Beachtung der Sterilität im OP, Isolierung der Wimpern und Lidränder mit einer sterilen Klebefolie, die Vermeidung von chirurgischen Manipulationen, z. B. hintere Kapselruptur oder Glaskörperverlust, und lange Operationsdauer. Ein exakter Wundverschluß schützt vor postoperativer Infektion.

Vor allem bei Risikopatienten (Diabetes mellitus, Tumorerkrankungen) sollte der intraokularen Irrigationsflüssigkeit ein Antibiotikum zugesetzt werden, so kann das postoperative Erkrankungsrisiko weiter reduziert werden. Für Polypropylen-Linsen (Prolene-Haptik) wurde ein erhöhtes Risiko für Endophthalmitis beschrieben. Bakterien scheinen an diesen besser zu haften als an Polymethylacrylat-Linsen (PMMA) (Speaker und Menikoff, 1993). Unmittelbar nach dem Eingriff gehören eine subkonjunktivale oder peribulbäre Antibiotikagabe zur Infektionsprophylaxe. Postoperative Nachkontrollen sollten selbstverständlich sein.

Die Prognose der infektiösen Endophthalmitis ist nach wie vor ernst und wird entscheidend durch die Erreger, den Eintrittsweg, die frühzeitige Diagnose und gezielte Therapieeinleitung sowie den Immunstatus der Patienten beeinflusst (Miño de Kaspar et al., 1993). Die Visusprognose korreliert zudem mit der Virulenz des Organismus, höher virulente Bakterienstämme gehen mit einer schlechteren Visusprognose einher (Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1996; Thompson et al., 1995). Trotz der relativ geringen Virulenz von *Staphylococcus epidermidis*, kann es, erst einmal ins Augeninnere gelangt, für eine schwere Endophthalmitis mit visusbedrohendem Verlauf ursächlich sein (Speaker et al., 1991; Ormerod et al., 1993; Kloos und Lambe, 1991; Grasbon et al., 1995). Insgesamt zeigt sich bei der postoperativen Endophthalmitis eine bessere Prognose als bei der posttraumatischen Infektion (meist Bacillus-Organismen). Pilze sind bei der endogenen Endophthalmitis mit einer besonders ungünstigen Prognose assoziiert, insbesondere bei raschem Fortschreiten der Symptomatik und einem Visus von Handbewegungen oder nur

noch Lichtscheinwahrnehmung. Als Komplikationen einer Endophthalmitis können Netzhautablösung, Sepsis oder auch eine Phthisis bulbi resultieren.

#### **A.1.7. Differentialdiagnose**

In die Differentialdiagnose miteinbezogen werden sollte jede andere intraokulare Entzündung, für die es neben einer gesteigerten Reaktion auf den chirurgischen Eingriff verschiedene Ursachen geben kann. Zurückbleibende Rindenreste der Linse können zu einer sterilen Uveitis anterior mit fibrinoidem Reizzustand führen und damit zu der Gefahr der Ausbildung hinterer Synechien. Intraoperativ in das Auge gelangtes Fremdkörpermaterial (Poliermittel, Talk) oder chemische Lösungen können eine, früher häufigere, toxische Reaktion hervorrufen, die als eine granulomatöse Iridocyclitis beobachtet werden kann. Die Symptome können Wochen bis Monate nach der Operation manifest werden (Forster, 1984). Ein Hornhautödem oder intraokulare Blutung können als Folge eines operativen Traumas auftreten. Bei Irisverletzung und auch Wund- oder Nahteinklemmung können sich Entzündungszeichen bis hin zu einem Abszess ausbilden. Zu ergänzen sind noch die sympathische Ophthalmie und eine neu auftretende Iritis oder Uveitis unabhängiger Genese, sowie eine entzündliche Reaktion auf präoperativ applizierte Miotika oder intraokulare Medikamente.

#### **A.1.8. Therapeutische Überlegungen**

Die schnellstmögliche Eliminierung der Erreger und eine möglichst frühzeitige Abwehr der körpereigenen Immunreaktion sind für den Erfolg der Endophthalmitis-Therapie entscheidend, wobei intravitreale Antibiotika eine zentrale Rolle spielen. Die Bedeutung der Vitrektomie und der systemischen Antibiose in der Behandlung der akuten postoperativen Endophthalmitis nach Katarakt-Operation ist umstritten.

Da die meisten Antibiotika nur unzureichende Glaskörperspiegel erreichen, ist die intravitreale Gabe am wirksamsten, aber damit auch das Risiko der retinalen Toxizität gegeben. Deswegen sollten geringer retinotoxische Substanzen zum Einsatz kommen. Bei den ersten Anzeichen einer Infektion muß sofort mit der Therapie begonnen werden, da der Verlauf häufig foudroyant sein kann. Bis die Ergebnisse der Kultur und der Resistenzbestimmung vorliegen, sollten Antibiotika gegeben werden, die sowohl grampositive als auch gramnegative Erreger abdecken. In der Augenklinik der LMU München wird von Kampik, Klauss und Miño de Kaspar ein Schema für die Standardtherapie empfohlen, mit dem 99 % der möglichen Keime abgedeckt werden können (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Therapie der akuten bakteriellen Endophthalmitis.

<p align="center"><b>Intravitreale Therapie</b> (Wiederholung nach 48 Stunden, wenn nötig)</p>	<p align="center"><b>Subkonjunktivale Therapie</b> (3-4 Tage)</p>
<p align="center">Amikacin 0,4 mg Vancomycin 1,0 mg</p>	<p align="center">Grampositive Keime: Vancomycin 25 mg Gramnegative Keime (Enterobakterien/Pseudomonas): Ceftazidim 100 mg</p>
<p align="center"><b>Intravenöse Therapie</b> (Blutwertkontrolle, 7 Tage)</p>	<p align="center"><b>Topische Therapie</b></p>
<p align="center">Grampositive/Gramnegative Keime: Imipenem 3×1 g/Tag</p>	<p align="center">Grampositive Keime: Ofloxacin-AT + Erythromycin-AT (stdl. im Wechsel) Ofloxacin-AS für die Nacht</p> <p align="center">Gramnegative Keime: Norfloxacin-AT + Erythromycin-AT (stdl. im Wechsel) Ofloxacin-AS für die Nacht</p>

Amikacin ist eine gute Alternative zu Gentamicin, da die bakterielle Resistenz gegen Gentamicin häufiger wird, zudem ist es weniger retinotoxisch (D'Amico et al., 1985). Durch langsame Injektion in die mittlere Glaskörperhöhle können retinale Funktionsminderungen (ERG-Veränderungen) verhindert werden. Amikacin deckt das grampositive und gramnegative Erregerspektrum ab, Vancomycin ist gegen koagulasenegative und koagulasepositive Kokken wirksam. Die topische und periokuläre Therapie hat wohl nur unterstützenden Charakter. Bedeutung bekommt sie, wenn die

Endophthalmitis von einer Keratitis oder Konjunktivitis ausgeht (Fechner und Teichmann, 2000).

Der Erfolg der systemischen Therapie bleibt nach wie vor wegen der schlechten Penetration der Substanzen durch die Blut-Retina-Schranke fraglich. Die Endophthalmitis Vitrectomy Study Group konnte 1995 keinen Vorteil der systemischen Antibiose zusätzlich zur intravitrealen Injektion nach Vitrektomie aufzeigen. Imipenem zeigte in einem tierexperimentellen Modell der Endophthalmitis einen effektiven Wirkspiegel (Engelbert, 1996).

Vorteile einer Vitrektomie sind die Reduktion der infektiösen Keime und Toxine und damit Hemmung der Entzündungsmediatoren, die Entfernung das Sehen beeinträchtigender traktiver Membranen und Glaskörperverdichtungen sowie eine verbesserte Penetration der Antibiotika.

Klauss et al. sehen den richtigen Zeitpunkt für eine Vitrektomie gegeben, wenn kein Funduseinblick mehr möglich und ein Visus mit Optotypen nicht mehr zu erreichen ist. Zur sofortigen Diagnostik bei einer Endophthalmitis sollte Material aus Vorderkammer und Glaskörper entnommen, Pseudophakos belassen, die hintere Linsenkapsel eröffnet und operativ entfernt sowie Vorderkammer- und Glaskörperaum möglichst vollständig ausgeräumt werden. Bei einer verzögerten postoperativen Endophthalmitis sollte vor der Vitrektomie eine Antibiose gegeben und erst bei Verschlechterung eine Vitrektomie mit intravitrealer Antibiose erfolgen (Lund und Kampik, 1983).

Die frühzeitige Pars-plana-Vitrektomie zeigte sich bei Endophthalmitis-Patienten mit schlechtem Visus (Lichtwahrnehmung) als prognostisch günstig und der alleinigen intravitrealen Therapie überlegen (Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1995).

## **A.2. *Staphylococcus epidermidis* und die anderen koagulasenegativen Staphylokokken**

### **A.2.1. Die Gattung *Staphylococcus***

Die grampositiven Kokken der Gattung *Staphylococcus* gehören zur Familie der *Micrococcaceae* und sind mikroskopisch meist haufenförmig oder auch traubenartig gruppiert, woher der Ausdruck stammt (staphylé: Weintraube). Sie sind unbeweglich, fakultativ anaerob und besitzen einen Durchmesser von etwa 1 µm. Einige Bakterien bilden orange oder gelbe Carotinoidpigmente. Die deutliche Pigmentierung der Kolonien und das Vorkommen von Katalase, einem eisenhaltigen Enzym, unterscheidet sie von den Streptokokken. Der Katalasetest kann diese in einem Bakterienstamm nachweisen. Die Staphylokokken werden in koagulasenpositive und koagulasenegative Stämme unterteilt, zu den ersteren zählen *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus intermedius*, zu den letzteren *Staphylococcus epidermidis* (vormals *Staphylococcus albus*) (Singleton, 1995).

Mit dem Koagulasetest wird nachgewiesen, ob die Staphylokokken Plasma koagulieren. Daneben existieren noch eine ganze Palette weiterer biochemischer Tests zum Nachweis von Stoffwechselreaktionen, die für die weitere Identifizierung und Klassifizierung der Staphylokokken von Bedeutung sind, z. B. die Metabolisierbarkeit verschiedener Kohlenhydrate („Zucker“), der Test auf Nitratreduktion, sowie Mikromethoden, mit denen eine Reihe von routinemäßigen Identifizierungstests zeitgleich durchgeführt werden können. Das von Kloos und Schleifer 1975 entwickelte API-System hat sich in der klinischen Bakteriologie besonders gut etablieren können. Staphylokokken können auch anhand genetischer Merkmale klassifiziert werden, z.B. durch Analyse ihrer spezifischen DNA-Nukleotidsequenz. Zu diesen molekularen Methoden gehören die DNA-DNA-Hybridisierung, die PCR sowie der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP). Von klinischer Bedeutung sind die 3 Hauptspezies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus*.

### **A.2.2. Koagulasenegative Staphylokokken - Allgemeiner Überblick**

Die koagulasenegativen Staphylokokken lassen sich von den koagulasepositiven Staphylokokkenarten durch die Abwesenheit von Blutplasmakoagulase abgrenzen. Das Pigment der Kolonien ist meist weiß, eine Hämolyse auf Blutagar durch von den Bakterien produzierte Hämolsine ist seltener als bei *Staphylococcus aureus* (Lütticken und Otte, 1984). Für die koagulasenegativen Staphylokokken wurden *Staphylococcus aureus*-ähnliche Toxine beschrieben (Kloos und Lambe, 1991). Die menschliche Hautflora wird von 11 dieser Spezies besiedelt (Archer, 1990), die sich in morphologischen, biochemischen und genetischen Merkmalen unterscheiden. *Staphylococcus epidermidis* ist der bei weitem häufigste transiente Keim der menschlichen Haut- und Schleimhäute, gefolgt von *Staphylococcus hominis*. Zu den eher weniger häufig isolierten Vertretern der koagulasenegativen Staphylokokken auf der Haut gehören *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus* und *Staphylococcus auricularis*, wobei die Spezies *Staphylococcus epidermidis* von der Haut des ganzen Körpers isoliert werden kann (Haas, 1994).

In der Vergangenheit wurde den koagulasenegativen Staphylokokken nur wenig klinische Beachtung zuteil, oftmals wurden sie als Bestandteil der körpereigenen Mikroflora voreilig als sekundäre Verunreiniger des Untersuchungsmaterials der Haut bei Infektionen angesehen. Durch den zunehmenden Einsatz von künstlichen Implantaten, Kathetern und anderem Fremdmaterial und die damit verbundene erhöhte Infektionsrate wurden sie immer öfter als Keime mit pathogenem Potential identifiziert, weshalb eine detaillierte Charakterisierung hinsichtlich Typisierung, genetischer Kriterien und auch der Antibiotikaresistenz auf zunehmendes Interesse stößt. *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus haemolyticus* gehören zu den bedeutendsten Keimen mit opportunistischer

Pathogenität. Ebenfalls von klinischer Signifikanz sind *Staphylococcus lugdunensis* und *schleiferi* (Kloos und Lambe, 1991).

Koagulasenegative Staphylokokken können als opportunistische Pathogene neben der Endophthalmitis eine nosokomiale Septikämie, Endokarditis bei künstlichem Herzklappeneratz, Peritonitis bei Peritonealdialyse, Harnwegsinfektionen, Osteomyelitis und allgemeine Implantatinfektionen verursachen, wobei viele Patienten prädisponierende Faktoren aufweisen, z. B. Diabetes mellitus, Nierenversagen oder auch AIDS (Archer, 1990; Kloos und Lambe, 1991).

Über die Pathogenität von *Staphylococcus epidermidis* ist gegenwärtig bekannt, daß diese Spezies in besonderem Maße in der Lage ist, durch Lektin und andere Adhäsine an der Oberfläche von Kunststoffen anzuhafte und sich dort anschließend zu replizieren und Mikrokolonien auszubilden, die sich aus Kokken und bakterieller Glykokalyx zusammensetzen. Die bakterielle Adhäsion spielt bei der Pathogenese einer bakteriellen Infektion allgemein eine entscheidende Rolle, denn sie ist Voraussetzung für die anschließende Kolonisation und Produktion extrazellulärer Produkte. Wichtig für die Adhäsion der Bakterien sind deren Oberflächenstrukturen, nämlich Fimbrien oder synonym Pili. Proteine oder Glykoproteine, die mit bestimmten Kohlenhydratstrukturen, z.B. mit Proteinen auf der Oberfläche von Biomaterialien, in spezifischer Weise reagieren, werden Lektine genannt. Diese spielen bei der Adhäsion ebenfalls eine Rolle. Fibronektine sind Strukturproteine bzw. Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und bei der Bindung von einigen Bakterien als Oponin an Oberflächen beteiligt sind. Einige Stämme von *Staphylococcus epidermidis* können durch Produktion einer extrazellulären Schleimschicht in einer Art „Matrix“ der Phagozytose, Immunabwehr und dem Angriff antimikrobieller Substanzen entgehen und so auf Kunststoffen persistieren. Die extrazelluläre Schleimschicht hemmt die Entstehung einer Entzündungsreaktion sowie spezifische adaptive Immunantworten. Chemotaxis, die Aufnahme der Bakterien durch Phagozytose und intrazelluläre Zerstörung werden wie auch andere Abwehrmechanismen des Wirts unterdrückt. Dieser bis zu 160 µm dicke Biofilm trägt somit als „Virulenzfaktor“ zu einem erhöhten Risiko einer Infektion mit koagulasenegativen Staphylokokken bei in den Körper eingebrachten Kunststoffen bei (Quie und Belani, 1987; Kloos und Lambe, 1991; Schmidt et al., 1998).

Alle Spezies der koagulasenegativen Staphylokokken sind reich an Plasmid-DNA, wobei die genaue Funktion von nur wenigen dieser Plasmide bekannt ist. Die Ausbildung einer Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika ist mit spezifischen Plasmiden der jeweiligen Keime assoziiert.

### **A.2.3. Definition der Antibiotikaresistenz**

Antibiotika behindern die Entwicklung der Mikroorganismen durch Blockierung lebenswichtiger Stoffwechsellleistungen, ohne bei geeigneter Dosierung in das

Stoffwechselgeschehen des Makroorganismus einzugreifen. Antibiotika, bakterizid oder bakteriostatisch, können charakteristischerweise an bestimmten Stellen in der Zelle wirken. Typische Angriffspunkte sind die Zellwand, die Cytoplasmamembran, die Maschinerie der Proteinsynthese oder ein Enzym der Nukleinsäuresynthese. Bakteriostase bedeutet, daß nach einer unterschiedlich langen Latenzphase die in Vermehrung befindlichen Keime im Wachstum gehemmt werden. Sulfonamide, Tetracycline, Chloramphenicol sowie die Makrolide wirken bakteriostatisch. Bakterizidie bedeutet, daß die Keimzahl, bestimmt in Form „koloniebildender“ Einheiten, um fast 100 % innerhalb kurzer Zeit reduziert wird. Zu diesen bakteriziden Substanzen zählen die Penicilline, Cephalosporine, Aminoglykoside und Vancomycin.

Wegen ihre selektiven Toxizität gegen Bakterien sind die Antibiotika für die Therapie bestimmter Krankheiten von enormer Bedeutung.

Die Resistenzprüfung gegen Antibiotika ist zum festen Bestandteil der mikrobiologischen Diagnostik geworden, da in zunehmenden Maße eine Resistenzentwicklung klinisch bedeutsamer Erreger beobachtet wird. Bakterien können sich resistent gegen manche Antibiotika zeigen, weil ganz einfach die Zielstruktur fehlt, z.B. Zellwandkomponenten wie das Murein für Penicilline. Weiterhin werden von den Bakterien Enzyme synthetisiert, die Antibiotika gezielt inaktivieren, z.B. die Penicillinase einiger *Staphylococcus*-Stämme (Singleton, 1995). Von dieser primären Resistenz läßt sich die sekundäre Resistenz abgrenzen. Bei dieser werden Resistenzen durch genetische Veränderungen wie etwa Mutation oder durch Übertragung von R-Plasmiden erworben (Forbes und Schaberg; 1982). Eine Einzelzelle kann eine Resistenz ohne vorherigen Kontakt mit einem Antibiotikum durch Mutation erwerben. Durch Selektion kann sich hieraus eine resistente Population entwickeln. Der Erwerb von Plasmiden mit Resistenzgenen, sogenannte R-Plasmide mit DNA-Charakter oder Transposon, ist für die Resistenzentwicklung von besonderer Bedeutung. Ursächlich sind hier inaktivierende Enzyme. Dazu gehören die  $\beta$ -Lactamasen, die eine Auftrennung des  $\beta$ -Lactamrings der Penicilline und Cephalosporine induzieren. Transferasen phosphorylieren oder acetylieren Aminoglykoside bzw. hemmen deren Aufnahme oder acetylieren Chloramphenicol. Durch diese Mechanismen werden die Substanzen unwirksam gemacht.

Zu den humanmedizinisch wichtigen Eigenschaften, die häufig an das Vorhandensein von Plasmiden gebunden sind, zählen neben der Antibiotikaresistenz (vor allem Mehrfachresistenz), die Fähigkeit zur Konjugation von Zellen, die Enterotoxinbildung, die Bildung von Hämolysinen, Kolonisationsfaktoren sowie die Bacteriocinbildung. Bacteriocine sind hochspezifische, antibakterielle Proteine, die von Bakterien gebildet werden, und mit abtötender Wirkung gegen andere Stämme derselben oder einer nah verwandten Bakterienart gerichtet sind. Es gibt ferner eine Reihe bakterizider Substanzen, die von Bakterien gebildet werden, z.B. lytische Enzyme, die nicht zu den Bacteriocinen zählen.

Die Resistenzprüfung von Erregern *in vitro* ermöglicht die Auswahl eines optimal wirksamen Antibiotikums. Das Empfindlichkeitsmuster gegenüber Antibiotika kann darüber hinaus zur Identifizierung des Pathogens hilfreich sein.

Bei der Ermittlung der Antibiotikasensibilität mittels „Plättchentest“, durch Ausbildung von Hemmhöfen ohne Bakterienwachstum nach Diffusion der aufgetragenen Antibiotika, kann das Empfindlichkeitsmuster des pathogenen Keimes durch Ausmessen der Hemmhofdurchmesser ermittelt werden. Beim „Verdünnungstest“ kann man die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Antibiotikums bestimmen, also die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der eine Wachstumshemmung der Bakterien auftritt.

Die Ergebnisse der Resistenzbestimmung werden mit „sensibel“, „partiellresistent“ oder auch „mäßig sensibel“ und „resistent“ bewertet.

#### **A.2.4. Antibiotikaresistenz der koagulasenegativen Staphylokokken**

Mosher und Vining haben 1992 Möglichkeiten der Resistenzentwicklung von vormalig empfindlichen Organismen aufgezeigt, die aus 4 wesentlichen Mechanismen bestehen. Zum einen die molekulare Umstrukturierung des antibiotischen Angriffspunktes, die Inaktivierung des Antibiotikums durch chemische Modifizierung über den Erwerb biochemischer Aktivität, die Veränderung der Zellmembranpermeabilität und damit Abwehr des antibiotischen Angriffs sowie zuletzt den Erwerb eines zusätzlichen Enzyms, welches dazu beiträgt, der inhibitorischen Reaktion auszuweichen. Verantwortlich gemacht für die zunehmende Resistenzhäufigkeit werden der unangemessen hohe Antibiotikaeinsatz in den letzten Jahrzehnten weltweit im Rahmen einer inadäquaten präoperativen Prophylaxe, eine empirische Therapie nicht lebensbedrohlicher Infektionen und der vermehrte Einsatz von Breitspektrum- oder kombinierten Antibiotika bei Infektionen durch primär sensible Keime (Jones, 1996). Die Antibiotikaempfindlichkeit der koagulasenegativen Staphylokokken ist außergewöhnlich heterogen und variabel.

Die meisten koagulasenegativen Staphylokokken zeigen sich durch die Bildung Plasmidkodierter Betalaktamasen resistent gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, z.B. Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme (Haas, 1994). Bei Staphylokokken werden die Plasmide mittels Bakteriophagen übertragen. Zusammen mit der DNA des Phagen gelangt die Plasmid-DNA in eine andere Bakterienzelle. Es kommt zur Transduktion. Um dem zunehmendem Selektionsdruck beim Einsatz verschiedener Antibiotika entgegenzuwirken, entwickeln die Bakterien Resistenzmechanismen, die es ihnen ermöglichen, zu überleben. Die hauptsächlich antibakterielle Wirkung der Penicilline besteht in ihrer Fähigkeit, spezifische bakterielle Enzyme, die für die Peptidoglykan-Biosynthese essentiellen penicillinbindenden Proteine (PBPs), zu hemmen. Die bei *Staphylococcus aureus* auftretende Meticillinresistenz ist mit dem *mecA*-Gen assoziiert, welches für ein spezielles penicillinbindendes Protein, nämlich das PBP2a kodiert. Dieses besitzt nur eine geringe Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. PBP2A spielt als Transpeptidase bei der

Zellwandsynthese eine wichtige Rolle und hindert in dieser Funktion die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika dabei, in der Zellmembran die Biosynthese der Zellwand-Peptidoglykane zu blockieren. Alle meticillinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämme besitzen dieses *mecA*-Gen, welches auch für die Übertragung der Meticillinresistenz auf die koagulasenegative Staphylokokken verantwortlich ist (Jones, 1996). Diese ist ein großes klinisches Problem, denn meticillinresistente koagulasenegative Staphylokokken (MRSE) zeigen wie die meticillinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) Kreuzresistenzen gegen alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Kloos und Lambe, 1991; Archer, 1990). Plasmide könne für verschiedene Funktionen codieren, z.B. für Enzyme, die bestimmte Antibiotika inaktivieren. Solche R-Plasmide (Resistenzplasmide) können die Wirtszelle gegenüber den entsprechenden Antibiotika resistent machen (Singleton, 1995). Spezifische Plasmide sind ebenfalls assoziiert mit dem Auftreten von Resistenzen gegen Makrolide, Tetracycline, Chloramphenicol, Trimethoprim und Aminglycoside bei den koagulasenegative Staphylokokken (Archer, 1990) oder mit anderen Virulenzfaktoren. Der Transfer erfolgt durch den Prozeß der Konjugation von einem Organismus zum anderen.

*Staphylococcus aureus* besitzt die Fähigkeit, zu einer Subpopulation zu mutieren (McNamara und Proctor, 2000). Diese kleinen Kolonie-Varianten von Staphylokokken stellen eine natürliche Gattung dar, deren Erstbeschreibung etwa 100 Jahre zurückliegt. Diese Varianten, die in verschiedene Klassen eingeteilt werden, wachsen langsam und besitzen eine Vielzahl atypischer Charakteristika. Grundlage hierfür ist wohl ein defektes Elektronentransportsystem, welches zu vielerlei Veränderungen dieser Organismen, beispielsweise zu einer verminderten alpha-Toxin-Produktion, zur Bildung winziger Kolonien mit fehlendem Pigment sowie zu einem ungewöhnlichen biochemischen Profil führt (Looney, 2000). Kleine Kolonie-Varianten von Staphylokokken gehen mit ausgeprägten persistierenden und rezidivierenden Infektionen beim Menschen und in kultivierten Endothelzellen, sowie einer vermehrten Antibiotikaresistenz gegenüber normalen *Staphylococcus aureus*-Stämmen einher (Looney, 2000; von Eiff et al., 1999; Vesga et al., 1996; Proctor et al., 1998).

Diese Subpopulationen induzieren eine geringere Gewebedestruktion als normale Staphylokokken (Looney, 2000; Pelletier et al., 1979), führen jedoch durch ihr langsames Wachstum und phänotypische Abweichungen zu einer erschwerten Diagnostik im klinischen mikrobiologischen Labor (Looney, 2000). Vesga et al. haben 1996 gezeigt, daß kleine Kolonie-Varianten von *Staphylococcus aureus* durch das intrazelluläre Milieu induziert werden und konnten damit einen möglichen pathophysiologischen Mechanismus für die Gewebepersistenz von Staphylokokken aufzeigen. Die Eigenschaft, intrazellulär zu überleben, verleiht diesen Organismen Schutz gegenüber dem Immunsystem sowie gegenüber einigen Antibiotika (Proctor und Peters, 1998).

Das Auftreten von kleinen Kolonie-Varianten von *Staphylococcus aureus* ist möglicherweise mit dem vermehrten Auftreten von Meticillinresistenz assoziiert. Diese kann auch durch  $\beta$ -Lactamase-Überproduktion, Produktion von Meticillinasen oder den Erwerb von strukturell veränderten penicillinbindenden Proteinen, unabhängig von dem

bereits erwähnten *mecA* auftreten (Brakstad und Maeland, 1997). Relativ wenig ist bekannt über Infektionen, die durch kleine Kolonie-Varianten von koagulasenegativen Staphylokokken hervorgerufen werden. Von Eiff und Vaudaux untersuchten 1999 kleine Kolonie-Varianten von *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus capitis* im Rahmen einer Sepsis nach Schrittmacher-Implantation und konnten verschiedene klinische und biochemische Charakteristika ähnlich denen kleiner Kolonie-Varianten von *Staphylococcus aureus* aufzeigen.

### A.3. Ziele der Studie

Die vorliegende, experimentelle Studie verfolgte folgende Ziele:

1. Es sollte ein standardisiertes, experimentelles Endophthalmitis-Modell am Kaninchenauge durch intravitreale Inokulation einer definierten Erregermenge von *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen mit vollsensiblen, partiell- und multiresistentem Antibiotikaresistenzspektrum provoziert werden
2. Der klinische Verlauf der Endophthalmitis sollte mittels Spaltlampenuntersuchung, indirekter Ophthalmoskopie in genau festgelegten Zeitabständen und nach bestimmten Kriterien untersucht und dokumentiert werden
3. Die Netzhautfunktion im Verlauf der Endophthalmitis sollte durch elektrophysiologische Untersuchungen mit dem Elektroretinogramm (ERG) in bestimmten Zeitabständen verfolgt und dokumentiert werden
4. Die infizierten Augen sollten nach Abschluß der klinischen und elektrophysiologischen Untersuchungen enukleiert und histopathologisch beurteilt werden
5. Die ermittelten klinischen, elektrophysiologischen und histopathologischen Daten der einzelnen Versuchsgruppen sollten hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Virulenz von antibiotikasensiblen- und resistenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen miteinander verglichen und statistisch ausgewertet werden

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht (Miño de Kaspar H, Hoepfner AS et al., Ophthalmology 2001;108:470-478)

## B. Material und Methoden

### B.1. Charakterisierung der Bakterienstämme

Es wurde eine Kategorisierung der verwendeten Stämme von *Staphylococcus epidermidis* in 3 Gruppen vorgenommen. Die Gruppe VS (antibiotisch vollsensibel) setzte sich aus den Laborstämmen 1 und 2 zusammen und wurde über BioMérieux, Stuttgart bezogen. Diese hatten die Nummer 29122 und 29123 der ATTC und zeigten sich empfindlich für alle getesteten Antibiotika. Getestet wurden Penicillin, Cefotaxim, Imipenem, Gentamicin, Amikacin, Ofloxacin, Erythromycin, Vancomycin, Chloramphenicol, und Tetracyclin. Die Gruppe PR (antibiotisch partiellresistent) bestand aus den Stämmen 3 und 4 und zeigte sich gegen ein bis drei der getesteten Antibiotika resistent. Die Gruppe MR (antibiotisch multiresistent) bestand aus den Stämmen 5 und 6, die per definitionem mindestens gegen Meticillin oder andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika resistent waren. Die Stämme der Gruppe VS (1, 2) wurden aus dem Labor bezogen, die Stämme der Gruppen PR und MR (3, 4, 5, 6) waren Isolate von Endophthalmitis-Patienten der Augenklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität, München.

Tabelle 2 zeigt das Resistenzspektrum für die jeweils getesteten Antibiotika von jedem der in dieser Studie verwendeten Bakterienstämme.

**Tabelle 2:** Antibiotikasensibilität der experimentellen *Staphylococcus epidermidis*-Stämme.

Getestetes Antibiotikum	Voll Sensibel		Partiell Resistent		Multi Resistent	
	1	2	3	4	5	6
Penicillin	S	S	S	S	R	R
Cefotaxim	S	S	S	S	R	R
Imipenem	S	S	S	S	R	R
Gentamicin	S	S	S	R	R	R
Amikacin	S	S	S	S	S	R
Vancomycin	S	S	S	S	S	S
Chloramphenicol	S	S	S	S	S	R
Tetracyclin	S	S	R	S	S	R
Ofloxacin	S	S	R	R	R	R
Erythromycin	S	S	S	R	R	R

S = sensibel für das getestete Antibiotikum

R = resistent gegen das getestete Antibiotikum

## B.2. Versuchstiere

Tierversuche sind in der heutigen Medizin für bestimmte Fragestellungen trotz leistungsfähiger in-vitro-Methoden auch heute noch nicht oder nicht völlig ersetzbar.

Aufgrund der positiven Erfahrungen mit Kaninchen im Bereich der experimentellen Forschung in der Ophthalmologie, wurden bei dieser experimentellen Studie weibliche weiße Neuseeland-Albinokaninchen mit einem Körpergewicht von 1,75 bis 2,25 kg als Versuchstiere eingesetzt und entsprechend den Richtlinien der „Association for Research in Vision and Ophthalmology“ (ARVO), Rockville, USA, für die Verwendung von Versuchstieren in der visuellen Forschung und der Ophthalmologie gehalten. Die Kaninchen waren in separaten Käfigen untergebracht mit konstantem Wechsel zwischen 12 stündlicher Beleuchtung und 12 stündlicher Abdunkelung.

Die Anatomie und Physiologie des Kaninchenauges ist der des Menschen bis auf wenige Unterschiede sehr ähnlich. Das Auge, die Hornhaut und Linse des Kaninchens sind im Verhältnis zum Körper- bzw. Bulbus sehr groß, der Ziliarkörper ist relativ schwach ausgebildet und das Netzwerk für den Kammerwasserabfluß ist nicht corneoskleral, sondern uveoskleral lokalisiert. Da Albinokaninchen kein Pigment besitzen, ist die Iris durchscheinend. Die becherförmig vorgewölbte Papille befindet sich etwa einen Papillendurchmesser oberhalb des horizontalen Meridians und entläßt myelinisierte Nervenfasern nach nasal und temporal, die im Verlauf von retinalen Gefäßen begleitet werden. Diese verlaufen beim Kaninchen eher intravitreal, entsenden aber Äste nach intraretinal. Da die übrige Netzhaut außerhalb dieser großen retinalen Gefäße nicht vaskularisiert wird, bezeichnet man die Kaninchen-Netzhaut auch als „merangiotisch“, also partiell vaskularisiert.

Die Elektrophysiologie des Kaninchenauges ist der des Menschen sehr ähnlich. Kaninchen zeigen eine relativ kleine Amplitude der ERG-Antworten mit einem maximalen Wert für die b-Welle von 400  $\mu$ V. Zudem gibt es recht große Differenzen zwischen den einzelnen Kaninchen als auch zwischen einzelnen ERG-Aufnahmen bei demselben Tier.

Die Tiere wurden vor Inokulation der Bakterien und der elektrophysiologischen Untersuchung mit einer intramuskulären Injektion von Ketaminhydrochlorid (35 mg/kg Körpergewicht), Lidocainhydrochlorid (5 mg/kg Körpergewicht) und einer topischen Applikation von Proparacainhydrochlorid 0,5 %-Augentropfen anästhesiert. In Hinblick auf die jeweilige Dosierung der Pharmaka wurden die erhöhte Stoffwechselleistung bei kleinen Tieren und das Körpergewicht der Kaninchen berücksichtigt. Zusätzlich wurden die Pupillen vor jeder Untersuchung mit Tropicamid 1 %- und Phenylephrin 2,5 %-Augentropfen dilatiert. Vor der klinischen Untersuchung wurden die Tiere mit Acepromacin (1-2 mg/kg Körpergewicht), intramuskulär verabreicht, leicht sediert. Somit konnte mittels spezieller Haltebox und Lidspreizer ein regelrechter Untersuchungsablauf gewährleistet werden.

### **B.3. Mikrobiologische Technik- Herstellung einer Bakteriensuspension definierter Erregerkonzentration und Resistenzbestimmung**

Nach Identifizierung der Bakterien (Genus und Spezies) wurden die jeweiligen *Staphylococcus epidermidis*-Stämme mittels einer sterilen Impfföse aus dem jeweiligen Erhaltungsmedium in sterile Trypticase Soya-Nährbouillon (TSB) inokuliert und bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurden von dieser Kultur ausgehend Blutagarplatten (BAG) mit den Organismen mittels Verdünnungsausstrich beimpft und für weitere 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach dieser Zeit wurden die isolierten Kolonien von *Staphylococcus epidermidis* in ein Dauerkulturmedium (Sanofi Diagnostics Pasteur, Freiburg) gebracht und noch einmal 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C „gelagert“.

Für die Herstellung der Bakteriensuspension wurden die Bakterien vom Dauermedium aus in sterile TSB eingebracht und 24 Stunden bei 37°C kultiviert und im Anschluß Schafblut-Agarplatten mit den Bakterien aus der TSB beimpft und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde eine isolierte Kolonie auf einer Schaffrischblut-Agarplatte ausgestrichen und noch einmal bei 37°C für 24 Stunden bebrütet.

Zur initialen Charakterisierung des Empfindlichkeitsmusters gegenüber Antibiotika jedes einzelnen Bakterienstammes wurde die Plättchen-Diffusions-Technik nach Kirby-Bauer auf Mueller-Hinton-2-Agar (BioMérieux) als Medium für die antibiotische Testung verwandt.

Von jedem der 6 *Staphylococcus epidermidis*-Stämme wurden je 2 einzelne Kolonien derselben Größe in TSB inokuliert und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die so kultivierte Bakterienbouillon wurde zentrifugiert und das gewonnene Sediment dreimal mit steriler Natriumchloridlösung gereinigt und resuspendiert, um eine hochkonzentrierte Stammlösung zu erhalten. Mit dieser Lösung wurde eine standardisierte 10fache Verdünnungsreihe hergestellt, wobei in 10er Schritten 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe in jeweils 0,9 ml sterile physiologische Kochsalzlösung (NaCl) pipettiert wurden. Schließlich konnte bei einer Verdünnung von  $10^{-10}$  die gewünschte Endkonzentration von  $2 \times 10^7$  „colony-forming units“ pro milliliter (CFU/ml) erreicht werden. Diese Bakteriensuspension definierter Erregerkonzentration, nämlich  $2 \times 10^7$  CFU, wurde für die jeweilige Inokulation der Kaninchenaugen mit den 6 *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen hergenommen.

Um sicherzugehen, daß die richtigen Bakterienstämme mit dem entsprechenden Resistenzspektrum vorliegen und um mögliche Kontaminationen der Kulturen vor der Inokulation der Erreger auszuschließen, wurden von dieser endgültigen Suspension ausgehend sowohl Trypticase Soya- als auch Mueller-Hinton-Agarmedien beimpft und bei 37°C über 24 Stunden inkubiert und eine Resistenzbestimmung mittels Agardiffusionstest vorgenommen. Als Qualitätskontrolle zur Typisierung der Stämme wurden die Ergebnisse mit denen der initialen Charakterisierung verglichen.

#### **B.4. Inokulation der Bakterien**

Dieselbe Konzentration der unterschiedlichen Bakterienstämme von *Staphylococcus epidermidis* wurde in alle Kaninchenaugen injiziert, um die Konsistenz und Reproduzierbarkeit der Bakterienmenge zu gewährleisten.

Nach vollständiger systemischer und lokaler Anästhesie der Kaninchen mittels der oben beschriebenen Pharmaka sowie Pupillendilatation wurde unter einem Mikroskop eine Parazentese der Vorderkammer mit einer 27-Gauge-Kanüle auf einer Tuberkulinspritze vorgenommen, wobei etwa 0,1 ml Kammerwasser aspiriert wurden. Anschließend erfolgte die Inokulation der Bakteriensuspension in das rechte Auge von jedem Kaninchen mittels intravitrealer Injektion von insgesamt 0,1 ml der  $2 \times 10^7$  CFU/ml-Bakteriensuspension über die Pars plana, etwa 2 mm hinter dem Limbus mit einer 27-Gauge-Kanüle auf einer Tuberkulinspritze. Dabei wurde die Nadelspitze möglichst zentral im Glaskörper plaziert, um die Linse nicht zu verletzen. Nach erfolgter Inokulation wurde das Kaninchenauge mittels indirekter Ophthalmoskopie hinsichtlich möglicher Fundusveränderungen durch die Manipulation untersucht.

Jeder der 6 Bakterienstämme wurde in je 6 einzelne Kaninchenaugen injiziert, wobei sich damit für jede der 3 experimentellen Gruppen, nämlich VS, PR und MR, eine Gesamtanzahl von 12 Kaninchen ergibt. Die linken Augen der Kaninchen fungierten als Kontrollaugen.

Von den insgesamt 36 Kaninchen starben eines aus der Gruppe PR und eines aus der Gruppe MR am ersten Tag post-Inokulation, möglicherweise als Komplikation der Anästhesie.

#### **B.5. Klinische Untersuchung und Dokumentation des Verlaufs**

Nach Inokulation der Bakterien wurden die Kaninchenaugen alle 3 Stunden in Hinblick auf erste klinische Zeichen einer beginnenden Endophthalmitis mit Spaltlampe und indirekter Ophthalmoskopie untersucht. Nach Beginn der Entzündung wurde der weitere Verlauf etwa alle 24 Stunden verfolgt und dokumentiert, wobei insbesondere der Grad der Entzündung der vorderen Augenabschnitte sowie derjenige der Glaskörpereintrübung zur Beurteilung herangezogen wurden. Die Bindehaut wurde in Hinblick auf den Schweregrad von Chemosis, Hyperämie und Exsudation, die Hornhaut auf eine eventuelle stromale Trübung, die Vorderkammer hinsichtlich Tyndall, Fibrin und Visualisierbarkeit der Iris, und letztere in Hinblick auf Hyperämie, Synechien und eine irreguläre Pupille hin untersucht.

Konnten keine Fundusdetails mehr mit der indirekten Ophthalmoskopie visualisiert werden, also Papille und retinale Gefäße, so wurde der Funduseinblick bei noch vorhandenem oder erloschenem Fundusrot als „obskuriert“ bewertet.

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung wurden mit der Spaltlampen- und Funduskamera fotografisch dokumentiert.

## **B.6. Elektrophysiologischer Versuchsaufbau**

Für die Beurteilung der Netzhautfunktion im Verlauf der Endophthalmitis wurde ein dunkeladaptiertes ERG unter Verwendung eines Licht-Elektroretinographie-Systems (PE 400; Tomey, Madrid, Spanien) 12 Stunden, 30 Stunden und 72 Stunden nach dem Zeitpunkt der Infektion aufgezeichnet und die Ergebnisse von allen Kaninchen einer Gruppe dokumentiert.

12 Stunden nach Inokulation der Bakterien konnten die dunkeladaptierten ERG-Antworten von 12 Kaninchen der Gruppe VS, von 10 Kaninchen der Gruppe PR (1 Kaninchen verstarb und das ERG von einem Kaninchen war nicht durchführbar), und von 11 Kaninchen der Gruppe MR (1 Kaninchen verstarb) aufgezeichnet werden. 30 Stunden nach Inokulation wurden die ERG-Antworten von 11 Kaninchen der Gruppe VS (1 ERG war aus technischen Gründen nicht durchführbar) und von je 11 Kaninchen der Gruppen PR und MR abgeleitet. 72 Stunden post-Inokulation wurden lediglich die funktionellen Antworten der Kaninchen der Gruppe VS gemessen, da das ERG der beiden PR- und MR-Gruppen bereits 30 Stunden nach Inokulation erloschen war. Lediglich bei 2 randomisierten Kaninchen dieser beiden Gruppen wurde ein ERG nach 72 Stunden abgeleitet, um das bereits nach 30 Stunden erloschene ERG zu bestätigen.

Die ERG-Messung wurde nach 30minütiger Dunkeladaptation aufgenommen. Diese Zeitspanne ist eigentlich zu kurz für eine vollständige Dunkeladaptation beim Kaninchen, aber der größte Teil dieses Prozesses ist innerhalb dieser Zeit abgeschlossen.

Die ERG-Antworten wurden zeitgleich vom experimentellen rechten Auge und vom linken Kontrollauge über Cornealelektroden abgeleitet. Die Referenzelektrode wurde an der zuvor rasierten Stirn befestigt und die Erdung erfolgte über eine am Ohr befestigte Elektrode; die ERG-Signale wurden verstärkt und gefiltert. Die dunkeladaptierten ERG-Antworten wurden durch einen elektronischen Kamera-Lichtblitz mit einer Xenon-Röhre (20 Joule) induziert.

Die elektroretinographische Analyse erfolgte durch Messung der durch Lichtstimulation erhaltenen Amplitude vom tiefsten Punkt der a-Welle bis zum höchsten Punkt der b-Welle. Als Index für die Netzhautfunktion des experimentellen Auges wurde der Quotient aus der b-Wellen-Amplitude des rechten Auges und der des linken Kontrollauges ermittelt.

Jedes Kaninchen wurde 6mal in Folge in einem Intervall von je 1 Minute einem Lichtblitz ausgesetzt und der durchschnittliche Wert evaluiert.

Um einen Standard-ERG-Wert für die normale Netzhautfunktion der in dieser Studie verwendeten Kaninchen zu bekommen und um die Genauigkeit der Messungen zu gewährleisten, wurden 6 Kontrollkaninchen (12 Augen) elektrophysiologisch untersucht,

um die physiologischen Schwankungen der b-Wellen-Amplituden des ERGs unter dunkeladaptierten Bedingungen zu dokumentieren.

Die durchschnittlichen ERG-Quotienten der Tiere jeder experimentellen Gruppe und der Kontrollgruppe wurden berechnet und ein statistischer Vergleich mittels Student-t-Test zwischen den Gruppen durchgeführt.

### **B.7. Enukleation der Bulbi und Qualitätskontrolle**

Am Tag 5 nach Inokulation der Bakterien wurden die Tiere mit einer intrakardialen Injektion von 500 mg Pentobarbital getötet und die Augen enukleiert. Anschließend wurde 0,1 ml Glaskörper durch eine Tuberkulinspritze mit einer 27-Gauge-Kanüle aspiriert. Das durch Vortexen in einem Reagenzglas homogenisierte Glaskörperaspirat wurde direkt im Anschluß in TSB inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert, um dann auf Schafblut-Agar-Platten für die Isolierung und Identifikation von Genus und Spezies kultiviert zu werden. Das Antibiotikaresistenzspektrum der Bakterien wurde mittels Kirby-Bauer-Agardiffusionstest überprüft.

### **B.8. Histopathologische Beurteilung**

Nach Enukleation am Tag 5 nach Inokulation der Bakterien wurden die Bulbi in 10%igem Formalin in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung fixiert. Von den insgesamt 36 experimentellen Augen konnten 2 Augen, je eines aus den Gruppen PR und MR, wegen dem frühzeitigen Tod der Kaninchen nicht histologisch beurteilt werden. Während dem Transfer vom Versuchslabor in das histopathologische Labor der Augenklinik der Universität München kam es zum Verlust von 2 Augen aus der Gruppe VS, 3 Augen aus der Gruppe PR und 3 Augen der Gruppe MR. Daraus resultierend wurden 10 Augen der Gruppe VS, 8 Augen der Gruppe PR und 8 Augen in der MR-Gruppe histopathologisch evaluiert.

Jedes Auge wurde in Höhe des Sehnerven in 2 Hälften geschnitten und die Schnittbilder in der Übersicht beurteilt und fotografisch dokumentiert. Die Proben wurden im Anschluß in Paraffin-Blöcke eingebettet und histologische Glasobjektträger durch 5-µm-Schnitte erstellt, die nach einem Standardschema mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Perjodsäure-Schiff-Reaktion, kombiniert mit Hämatoxylin (PAS), und nach Gram gefärbt wurden. Die histologischen Präparate wurden im Anschluß nach einem bestimmten Schema hinsichtlich der Quantifizierung des Entzündungsgrades von Cornea, Iris, Glaskörperbasis, Ziliarkörper und Netzhaut anhand eines Scores beurteilt. In Tabelle 3 ist das verwendete Schema für die Ermittlung des jeweiligen Entzündungs-Scores der einzelnen Augenabschnitte dargestellt. Für die Beurteilung der Netzhautentzündung wurden drei unterschiedliche Regionen

begutachtet: die Netzhaut zentral, ungefähr 20° parazentral, und im Bereich der Ora serrata. Die Netzhaut wurde sowohl nasal als auch temporal untersucht, um eventuelle Fehler in der Beurteilung durch eine lokalisierte Entzündung zu vermeiden.

**Tabelle 3:** Schema für die histopathologische Beurteilung der mit *Staphylococcus epidermidis*- infizierten Kaninchenaugen.

Score	Cornea	Irisgefäße	Ziliar-körper	Glaskörper-basis	Retina
1	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	0-1 Infiltrate <sup>1</sup> , kleinere limbische Infiltrate	1-10 Gefäße <sup>2</sup>	0-50 Zellen <sup>3</sup>	0-20 Zellen <sup>3</sup>	Zystoide Veränderungen, bis zu zweifache Dickenzunahme <sup>4</sup> , wenige Infiltrate <sup>1</sup>
3	1-2 Infiltrate, deutliche limbische Infiltrate	11-20 Gefäße	50-100 Zellen	20-50 Zellen	Zystoide Veränderungen, mehr als doppelte Dickenzunahme, mäßige Anzahl von Infiltraten, Photorezeptoren sichtbar
4	3-5 Infiltrate, deutliche limbische Infiltrate	21-30 Gefäße	100-200 Zellen	50-150 Zellen	Erkennbare Netzhaut-Strukturen- und Schichten, deutliche Infiltrate von Leukozyten, keine Photorezeptoren sichtbar
5	3-5 Infiltrate, sehr deutliche limbische Infiltrate und Schwellung	31-50 Gefäße	> 200 Zellen	> 150 Zellen	Wenig erkennbare Netzhaut-Strukturen, massive Infiltrate von Leukozyten
6	> 5 Infiltrate, sehr deutliche limbische Infiltrate und Schwellung	> 50 Gefäße	Völlige Destruktion des Ziliarkörpers	Fehlende Trennung von Ziliar- und Glaskörper	Komplette Destruktion der Netzhaut, keine erkennbaren Strukturen

<sup>1</sup> Infiltrate = Infiltration durch Entzündungszellen

<sup>2</sup> Gefäße = Anzahl der Gefäße bei 40facher Vergrößerung

<sup>3</sup> Zellen = Anzahl der Entzündungszellen bei 40facher Vergrößerung

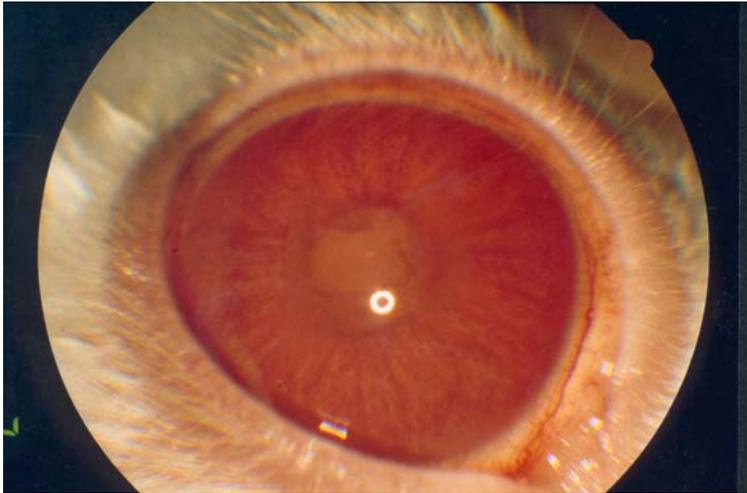
<sup>4</sup> Dicke = Dicke der Netzhautschichten

## **C. Ergebnisse**

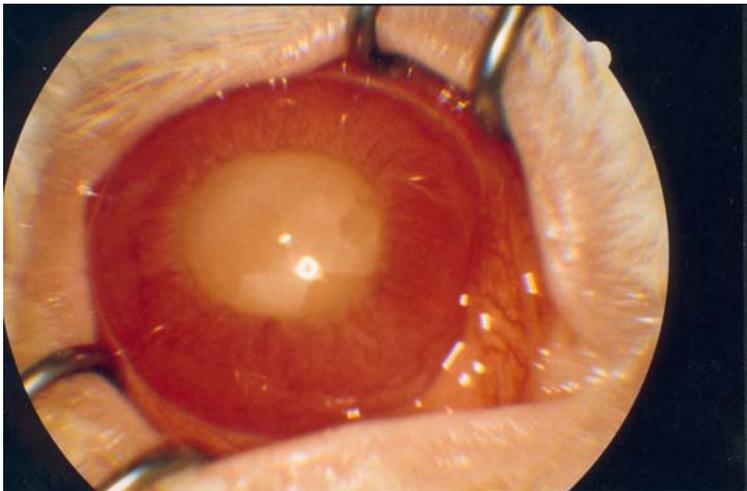
### **C.1. Ergebnisse der klinischen Untersuchung**

Die ersten Symptome einer beginnenden Endophthalmitis zeigten sich ungefähr 12 Stunden nach Inokulation der Bakterien in allen experimentellen Augen. Zu den charakteristischen Zeichen der Endophthalmitis gehörten eine konjunktivale Hyperämie, Chemosis, Zellen und Fibrin in der Vorderkammer, Hypopyon, Glaskörperzellen- und Trübung bis hin zum Verlust des roten Fundusreflexes. Der Schweregrad der Bindehaut- und Vorderkammerreaktion stellte sich im Verlauf der Entzündung als variable und unbeständige Größe dar. Lediglich die Opakifikation des Glaskörpers, definiert als mit der indirekten Ophthalmoskopie nicht mehr zu visualisierende Papille und Netzhautgefäße, erwies sich als irreversibler und verlässlicher Parameter für den weiteren Verlauf der Endophthalmitis.

Bei den klinischen Untersuchungen zeigte sich für die mit partiell- und multiresistenten Erregern infizierten Augen ein Trend hin zu einer schwereren Entzündungsreaktion. Zudem war die Opakifikation des Glaskörpers in den Gruppen PR und MR deutlich stärker ausgeprägt als in der Gruppe VS. Statistisch konnte hinsichtlich des klinischen Verlaufs kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe VS und den beiden Gruppen PR und MR festgestellt werden. Anhand der Fotodokumentation lassen sich die Unterschiede verdeutlichen. In Abbildung 2 ist das Bild der Endophthalmitis eines mit vollempefindlichen Bakterien infizierten rechten Auges am Tag 1 post-Inokulation dargestellt. Diesem ist zum selben Untersuchungszeitpunkt eine Endophthalmitis, induziert durch resistente Erreger, in Abbildung 3 gegenübergestellt. In den Abbildungen lassen sich die klinischen Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen verdeutlichen.



**Abbildung 2:** Rechtes Auge eines mit vollem empfindlichen Keimen infizierten Auges mit noch erhaltenem Fundusrot am Tag 1 nach Infektion.

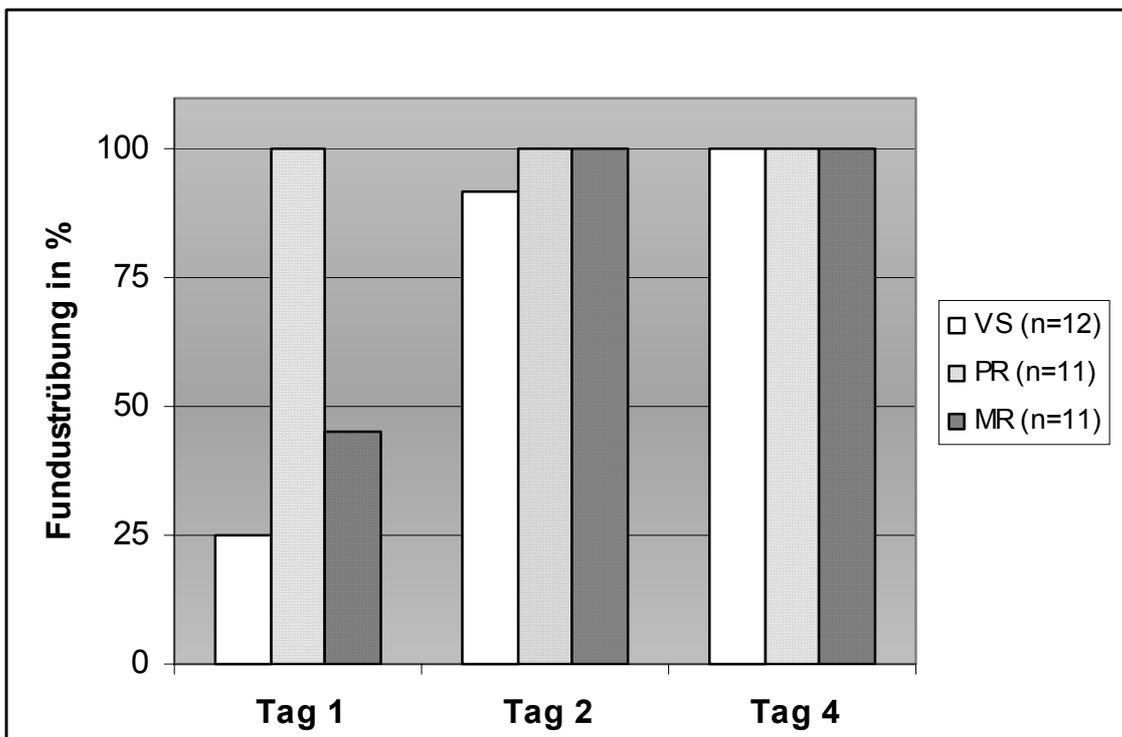


**Abbildung 3:** Rechtes Auge eines mit multiresistenten Keimen infizierten Auges mit Verlust von Fundusrot am Tag 1 nach Infektion.

Der prozentuale Anteil der Augen mit Verlust des roten Fundusreflexes war in der Gruppe VS niedriger als in den Gruppen PR und MR an den Tagen 1 und 2 nach Inokulation der Erreger, obwohl dies, wie schon erwähnt, statistisch nicht signifikant war. Am Tag 4 post-Inokulation zeigte kein Auge mehr Fundusrot. In Tabelle 4 sind die Kaninchen mit fehlendem Funduseinblick im Verhältnis zu der Gesamtanzahl der Kaninchen innerhalb einer Gruppe an den jeweiligen Untersuchungstagen nach Inokulation der Bakterien sowie in Abbildung 4 der entsprechende prozentuale Verlauf der Endophthalmitis in Hinblick auf die zunehmende Funduseintrübung in allen 3 experimentellen Gruppen dargestellt.

**Tabelle 4:** Klinischer Verlauf der experimentellen Endophthalmitis in Bezug auf die zunehmende Opakifikation des Glaskörpers mit Verlust des roten Fundusreflexes in den 3 experimentellen Gruppen an den Tagen 1, 2 und 4 post-Inokulation.

Gruppen	Tag 1	Tag 2	Tag 4
VS	3 von 12 Kaninchen (25 %)	11 von 12 Kaninchen (92 %)	12 von 12 Kaninchen (100 %)
PR	11 von 11 Kaninchen (100 %)	11 von 11 Kaninchen (100 %)	11 von 11 Kaninchen (100 %)
MR	5 von 11 Kaninchen (45 %)	11 von 11 Kaninchen (100 %)	11 von 11 Kaninchen (100 %)



**Abbildung 4:** Prozentualer Vergleich der Inzidenz der Kaninchen mit fehlendem roten Fundusreflex (komplette Funduseintrübung) im Verlauf der experimentellen intraokularen Infektion zwischen den 3 experimentellen Gruppen (Infektion mit vollempfindlichen, partiellresistenten und multiresistenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen) an den Tagen 1, 2 und 4 nach Inokulation.

## C.2. Funktionelle Ergebnisse (Elektroretinogramm)

Der Durchschnitt der 6 b-Wellen-ERG-Quotienten in der Kontrollgruppe betrug 0,96 mit einer Standardabweichung von 0,12. Dieser recht große Wert läßt sich durch die bereits erwähnte Schwankungsbreite bei Kaninchen erklären. Die elektrophysiologischen Messungen wurden 12, 30 und 72 Stunden nach Inokulation der Bakterien durchgeführt. In allen 3 experimentellen Gruppen war nach 72 Stunden kein ERG mehr ableitbar.

Tabelle 5 zeigt die evaluierten p-Werte des statistischen Vergleichs zwischen den 3 experimentellen Gruppen und dem Mittelwert aus den ERG-Quotienten der Kontrollgruppe.

**Tabelle 5:** Statistische Auswertung der elektrophysiologischen Daten von infizierten- und kontralateralen Kontrollaugen (Mittelwerte aus 6 unterschiedlichen Messungen). Vergleich zwischen Kontrollgruppe (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung =  $0,96 \pm 0,12$ ) und jedem einzelnen Stamm der 3 experimentellen Gruppen und den Gruppen VS, PR und MR insgesamt, 12 und 30 Stunden nach Inokulation (Student-t-Test).

Bakterienstamm	12 Stunden	30 Stunden
Stamm 1	$1,01 \pm 0,12$ (p = 0,505)	$0,48 \pm 0,28$ (p < 0,01)
Stamm 2	$0,96 \pm 0,18$ (p = 0,942)	$0,81 \pm 0,29$ (p = 0,001)
Gruppe VS (Stämme 1+2)	$0,99 \pm 0,15$ (p = 0,696)	$0,65 \pm 0,28$ (p < 0,001)
Stamm 3	$0,74 \pm 0,18$ (p = 0,042)	—
Stamm 4	$0,71 \pm 0,11$ (p = 0,007)	—
Gruppe PR (Stämme 3+4)	$0,72 \pm 0,14$ (p = 0,005)	—
Stamm 5	$0,88 \pm 0,10$ (p = 0,254)	—
Stamm 6	$0,93 \pm 0,17$ (p = 0,771)	—
Gruppe MR (Stämme 5+6)	$0,90 \pm 0,13$ (p = 0,408)	—

VS = vollsensibel

PR = partiellresistent

MR = multiresistent

Ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) konnte beim Vergleich der Gruppe PR und der Kontrollgruppe 12 Stunden nach Inokulation der Bakterien beobachtet werden. Für die Gruppen VS und MR, verglichen mit der Kontrollgruppe, ergab die statistische Auswertung zum gleichen Zeitpunkt keinen signifikanten Unterschied.

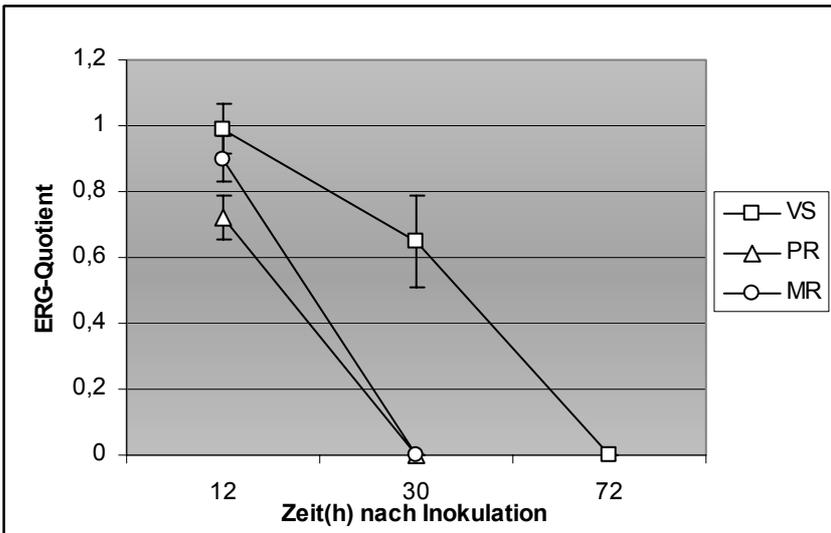
12 und 30 Stunden post-Inokulation war der Index für die Netzhautfunktion (Verhältnis der b-Welle vom experimentellen Auge zu der des Kontrollauges) in den Gruppen PR und MR niedriger als in der Gruppe VS. Nach 12 Stunden zeigten die b-Wellen-Quotienten der Gruppen VS (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung =  $0,99 \pm 0,15$ ) und MR (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung =  $0,90 \pm 0,13$ ) signifikant höhere Werte als die der Gruppe PR (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung =  $0,72 \pm 0,14$ ); Student-t-Test: Gruppe VS,  $p < 0,001$  und Gruppe MR,  $p < 0,01$ .

30 Stunden nach Inokulation war das ERG der Gruppe VS verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt mit einem b-Wellen-Quotienten von  $0,65 \pm 0,28$ , konnte aber im Gegensatz zu den beiden Gruppen PR ( $p < 0,01$ ) und MR ( $p < 0,01$ ), deren ERG-Signale nach 30 Stunden komplett erloschen waren, zu diesem Zeitpunkt noch abgeleitet werden. Die ERG-Ergebnisse sind in Tabelle 6 und Abbildung 5 zusammengefaßt. In Abbildung 6 sind die Kurvenverläufe von 2 experimentellen Gruppen gegenübergestellt.

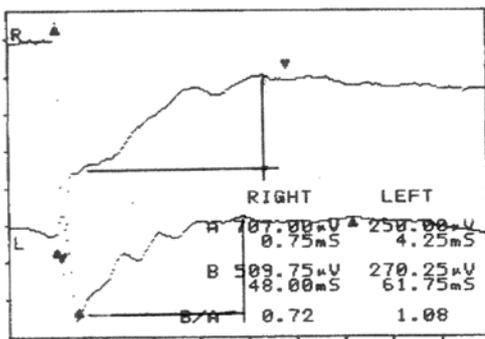
**Tabelle 6:** Durchschnittswerte der Elektroretinogramm-Quotienten\* aller 3 Studiengruppen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

<b>Zeit (h) nach Inokulation</b>	<b>Voll sensibel</b>	<b>Partiell resistent</b>	<b>Multi resistent</b>
12	$0,99 \pm 0,15$	$0,72 \pm 0,14$	$0,90 \pm 0,13$
30	$0,65 \pm 0,28$	0,00	0,00
72	0,00	0,00	0,00

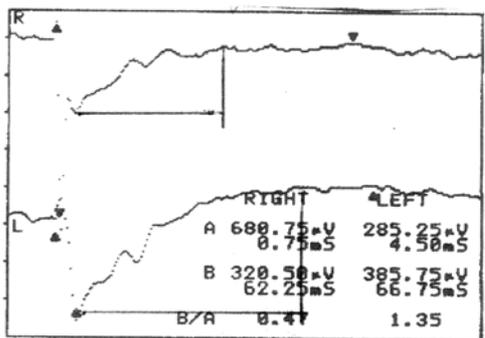
\*Verhältnis von mit *Staphylococcus epidermidis*-infizierten Augen zu gesunden Kontrollaugen



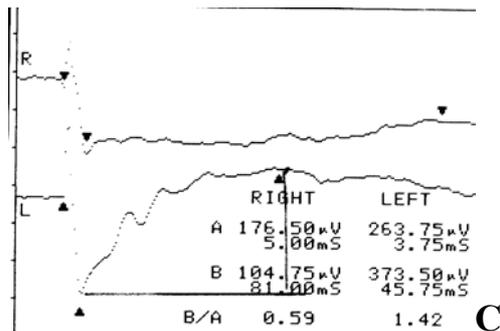
**Abbildung 5:** Vergleich der Netzhautfunktion mit Elektroretinogramm. Die Elektroretinogramm-Quotienten aus experimentellen- und Kontrollaugen jeder Gruppe werden 12, 30 und 72 Stunden nach Inokulation miteinander verglichen.



A



B



**Abbildung 6:** 3 ERG-Kurvenverläufe von experimentellem rechten- und linkem Kontrollauge mit Darstellung der jeweiligen Amplituden als Ausgangsdaten für die b-Wellen-Quotientenberechnung. A zeigt das nahezu normale ERG eines mit vollempfindlichen Bakterien infizierten Kaninchens 12 Stunden nach Inokulation, B zeigt die im Verhältnis zum linken Auge bereits deutlich reduzierte Amplitude eines experimentellen Auges aus der Gruppe PR zum gleichen Zeitpunkt, und C demonstriert das Nulllinien-ERG eines Kaninchens aus der Gruppe PR 30 Stunden nach Infektion.

### C.3. Beurteilung der Glaskörperkulturen

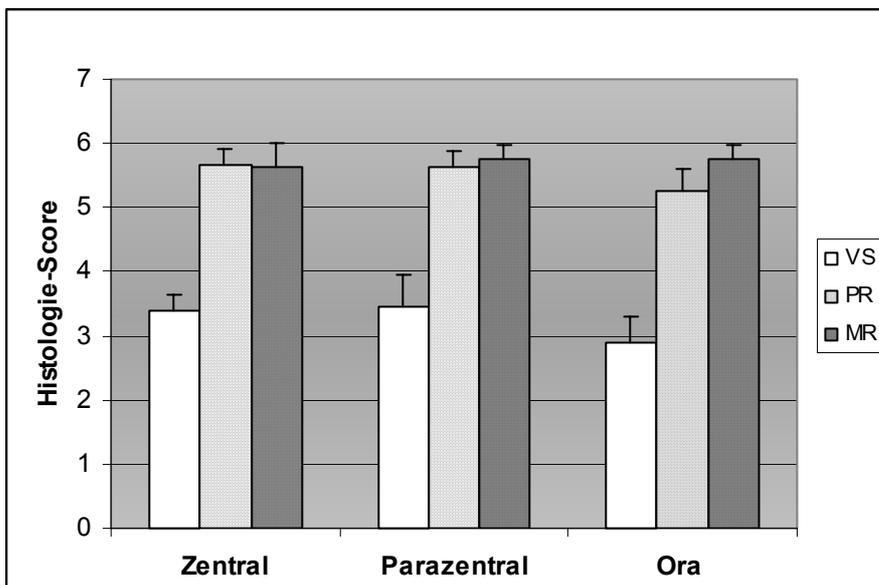
Am Tag 5 nach Inokulation der differenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämme wurden die entzündeten Augen der zuvor getöteten Kaninchen enukleiert und das aspirierte Glaskörper-Homogenisat kultiviert. Alle drei experimentellen Gruppen VS, PR und MR zeigten in jeweils ungefähr einem Drittel der Glaskörperaspirate bakterielles Wachstum. Die aus diesen kulturpositiven Glaskörperaspiraten isolierten Stämme und deren Antibiotikaresistenzspektrum waren in allen drei Gruppen mit den jeweils inokulierten Stämmen von *Staphylococcus epidermidis* der Gruppen VS, PR und MR identisch. Die verbliebenen Glaskörperaspirate der jeweiligen experimentellen Gruppen waren kulturnegativ.

#### C.4. Ergebnisse der histopathologischen Analyse

Die Resultate der histopathologischen Beurteilung der Netzhaut, zentral, parazentral und in der Nähe der Ora serrata sind in Tabelle 7 und Abbildung 7 dargestellt.

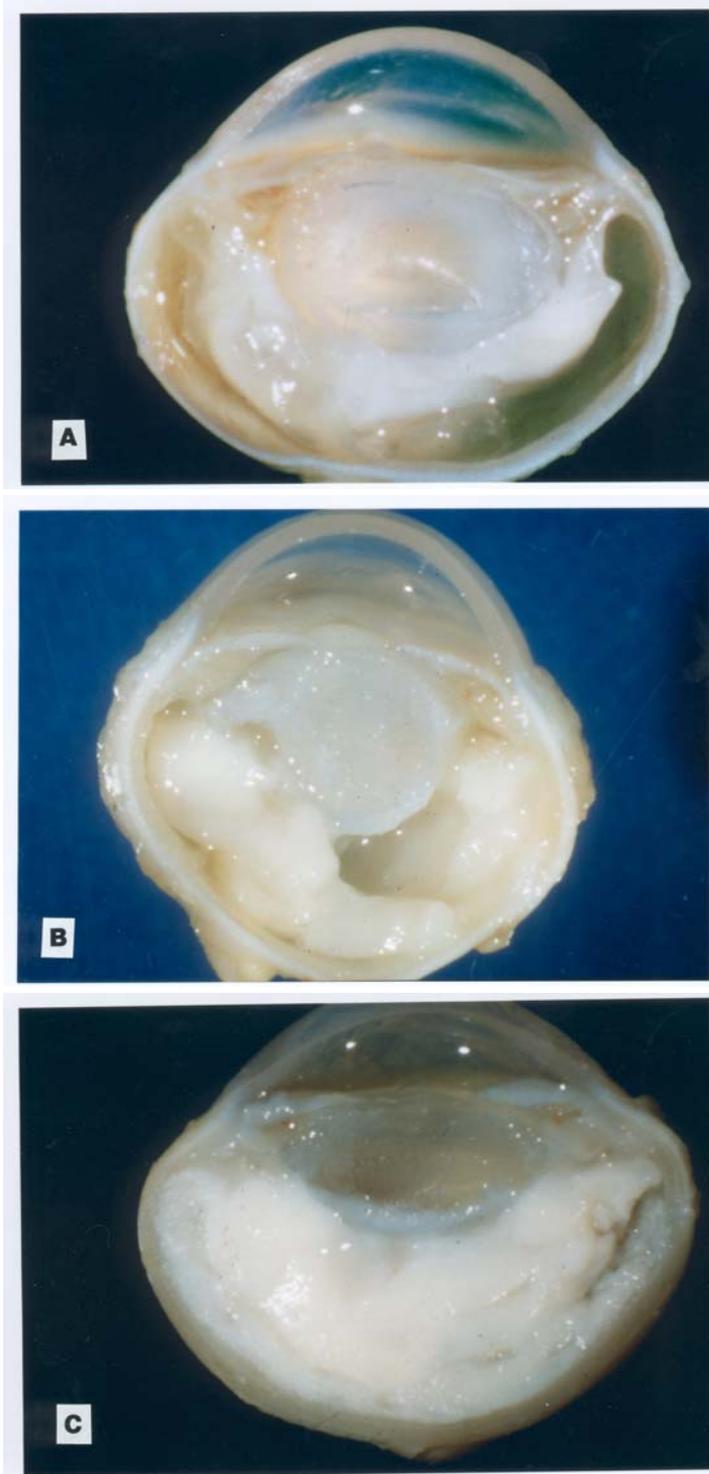
**Tabelle 7:** Histopathologischer Score (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) für die 3 experimentellen Gruppen bezogen auf 3 unterschiedliche Netzhaut-Regionen am Tag 5 nach Inokulation der Bakterien

Netzhaut lokalisation	Voll empfindlich	Partiell resistent	Multi resistent
Zentral	3,38 $\pm$ 0,49	5,67 $\pm$ 0,48	5,63 $\pm$ 0,72
Parazentral	3,46 $\pm$ 0,98	5,63 $\pm$ 0,49	5,75 $\pm$ 0,45
Ora serrata	2,88 $\pm$ 0,85	5,25 $\pm$ 0,68	5,75 $\pm$ 0,45

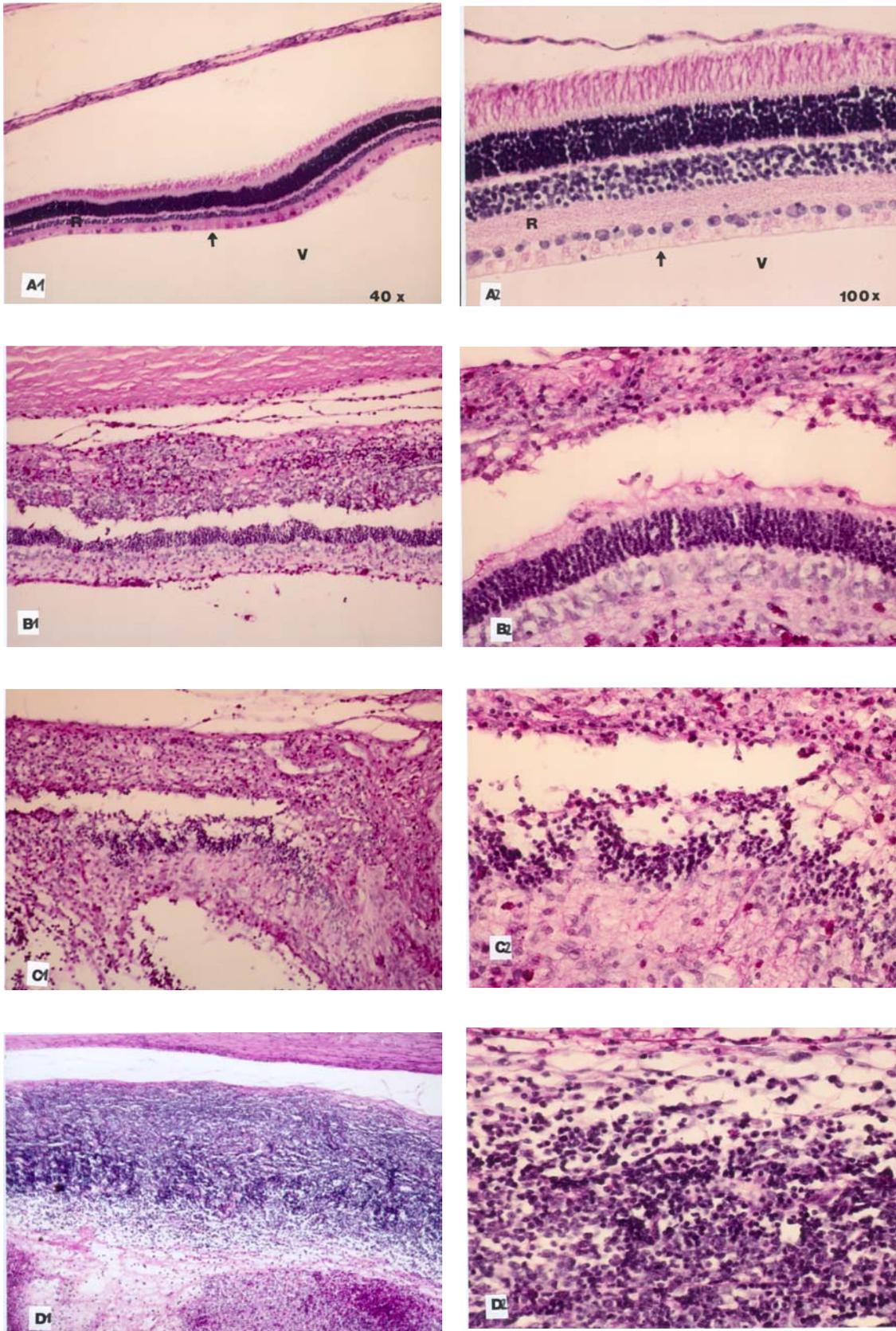


**Abbildung 7:** Vergleich des morphologischen Bildes differenter Netzhautbereiche (zentrale Netzhaut, parazentrale Netzhaut und Ora serrata) am Tag 5 nach Inokulation der Bakterien anhand eines histologischen Scores zwischen den 3 mit *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen unterschiedlicher Antibiotikaresistenz inokulierten experimentellen Gruppen (vollsensibel, partiellresistent und multiresistent).

Die Analyse des histologischen Scores hinsichtlich entzündlicher Veränderungen der unterschiedlichen Regionen der Netzhaut ergab deutliche Unterschiede zwischen den 3 experimentellen Gruppen. In der Gruppe VS zeigte die Netzhaut der infizierten Augen eine weniger stark ausgeprägte Entzündung als in den Gruppen PR und MR. Der Histologie-Score für die Netzhaut insgesamt, also zentrale Netzhaut, parazentrale Netzhaut und Ora serrata, sowohl nasal als auch temporal, bestätigte dieses Ergebnis. Die Cornea, Iris, Glaskörperbasis und der Ziliarkörper wurden ebenfalls histopathologisch beurteilt. Die Ergebnisse des histologischen Scores für die Cornea und die jeweilige Anzahl der Irisgefäße erwiesen sich als variabel und unbeständig in allen untersuchten Augen. Aber es konnte in den Gruppen PR und MR die Tendenz zu einer stärkeren Destruktion des Gewebes durch Entzündungszellen als in der Gruppe VS festgestellt werden. Die histologische Analyse von Glaskörperbasis und Ziliarkörper zeigte denselben Trend. In Bezug auf den Entzündungsgrad aller untersuchten Gewebe des Auges zeigte sich also insgesamt ein milderes Bild der Entzündung in den mit vollempfindlichen Keimen infizierten Augen und eine deutlichere Desintegration der anatomischen Strukturen in den mit resistenten Erregern infizierten Augen. In Abbildung 8 sind 3 repräsentative Schnittbilder in der Übersicht der jeweiligen experimentellen Gruppen dargestellt und in Abbildung 9 werden die gefärbten histologischen Schnitte von Netzhaut und Glaskörper der unterschiedlichen experimentellen Gruppen demonstriert.



**Abbildung 8:** Entzündliche Veränderungen in einem Kaninchen-Modell induziert durch experimentelle Infektion mit differenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen. Es zeigt sich eine deutliche zelluläre Infiltration von Glaskörper, Chorioidea sowie ein Netzhautödem. Die entzündlichen Veränderungen sind weniger stark ausgeprägt nach Infektion mit einem vollsensiblen Bakterienstamm (A) im Vergleich mit der Infektion durch einen partiellresistenten (B) oder multiresistenten (C) Bakterienstamm.



**Abbildung 9:** Histologische Veränderungen in einem Kaninchen-Modell der Endophthalmitis, induziert durch unterschiedliche Stämme von *Staphylococcus epidermidis*, 5 Tage nach Inokulation der Bakterien. A1+A2: Netzhautschnitt eines nicht

infizierten, gesunden Kontrollauges (40× + 100× Vergrößerung). B-D: Netzhautschnitte der mit differenten antibiotikaempfindlichen Stämmen infizierten Augen (40× + 100× Vergrößerung). B1+B2: vollsensibel, C1+C2: partiellresistent, D1+D2: multiresistent. Die Netzhaut in C und D zeigt eine deutlich stärkere entzündliche Infiltration als in B, hier ist die Netzhautarchitektur wesentlich besser erhalten.

R = Retina

V = Glaskörper (vitreous cavity)

Pfeil = Membrana limitans interna der Netzhaut

Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

## D. Diskussion

Die koagulasenegativen Staphylokokken sind die am häufigsten isolierten Organismen bei postoperativer Endophthalmitis (Archer, 1990; Ormerod et al., 1993; Forster, 1984), insbesondere *Staphylococcus epidermidis* (Heaven et al., 1992; Bannerman et al., 1997). Es wird allgemein angenommen, daß die Erreger der postoperativen Endophthalmitis von der patienteneigenen normalen bakteriellen Flora der Binde- und Lidhaut stammen (Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1996; Speaker et al., 1991; Heaven et al., 1992). Weitere potentielle Kontaminationsquellen umfassen chirurgische Instrumente, Intraokularlinsen, Wärme- und Druckregulierungssysteme sowie Chirurgen und Operationspersonal (Miño de Kaspar et al., 2000; Mandelbaum et al., 1995; Scott et al., 1995). Durch Verbesserungen in der chirurgischen Technik, Instrumentierung und Sterilität, sowie durch Einführung prophylaktischer Desinfektionsmittel und Antibiotika hat die Inzidenz der postoperativen Endophthalmitis in den letzten Jahrzehnten abgenommen (Sunaric-Mégevand und Pournaras, 1997; Lund und Kampik, 1983). Dennoch fürchtet jeder Operateur diese schwerwiegende Komplikation nach intraokularer Chirurgie, die noch immer in einem Verhältnis von etwa 1 zu 1000 bis 1500 der Fälle postoperativ auftritt (Kattan et al., 1991; Aaberg et al., 1998). Die Visusprognose hängt entscheidend von der frühzeitigen Diagnosestellung, vom jeweiligen Erreger und der sofortigen medizinischen und operativen Therapie ab (Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1996). Wie mehrere Studien gezeigt haben, lag die Kontaminationsrate der Vorderkammer-Keimspezies mit Bakterien am Ende der Operation bei bis zu 22% (Ariyasu, 1993). Trotzdem liegt die Inzidenz der postoperativen Endophthalmitis weit unter diesem Wert, möglicherweise spielen in diesem Zusammenhang die geringe Keimzahl und das normalerweise intakte Abwehrsystem des Patienten (Breitbach und Spitznas, 1990) bzw. Wirtsfaktoren eine signifikante Rolle (Pleyer et al., 1992). Toxische Faktoren aus der Entzündungsreaktion des Körpers, wie Leukozyten und Komplement, können das Wachstum von Keimen behindern (Lohmann et al., 1997). Auch ist in diesem Zusammenhang interessant, daß in der Literatur bakterizide Eigenschaften des kontaminierten Glaskörpers gegenüber *Staphylococcus epidermidis* beschrieben wurden (Meredith et al. 1990). Die Variabilität in der klinischen Präsentation und die resultierende Sehschärfe sind eng mit der Virulenz des auslösenden Erregers verknüpft (Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1996; Thompson et al., 1995). Eine Endophthalmitis, die durch höher virulente Keime, z. B. gramnegative Stäbchen, hervorgerufen wird, geht mit einer ungünstigeren Prognose einher (Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, 1996), aber auch *Staphylococcus epidermidis* kann trotz seiner niedrigen Virulenz zu massiven Funktionsverlusten der betroffenen Augen führen (Ormerod et al., 1993). *Staphylococcus epidermidis* besitzt die Fähigkeit, im Wirtsorganismus zu persistieren und durch Lektine und andere Adhäsine an Kunststoffen wie Plastik oder Glas zu haften. Darüber hinaus ist diese Spezies in der Lage, durch extrazelluläre Schleimproduktion einen oberflächlichen Biofilm auszubilden, der diese gegen Phagozytose und den Angriff antimikrobieller

Substanzen abkapselt (Quie und Belani, 1987; Schmidt et al., 1998; Kloos und Lambe, 1991). Eine *Staphylococcus epidermidis*-induzierte Endophthalmitis ist eher mit einer humoralen als mit einer verzögerten Antwort der Immunabwehr assoziiert (Pleyer et al., 1992), und kann, resultierend aus der Freisetzung von Toxinen und Enzymen durch den pathogenen Erreger und das Immunsystem des Wirtsorganismus, einen Verlust der Bulbusintegrität und des Sehvermögens bedeuten (Hassan, 1994).

In diesem Tiermodell für die Studie der klinischen, funktionellen und histopathologischen Aspekte einer experimentellen Endophthalmitis, die durch Inokulation von *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen mit differentem Antibiotikaresistenzspektrum provoziert wurde, haben wir Unterschiede zwischen den jeweiligen experimentellen Gruppen feststellen können. In den mit resistenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen infizierten Kaninchenaugen bot sich das klinische, funktionelle und histopathologische Bild einer deutlich schwereren intraokularen Entzündung im Vergleich zu dem eher milderen Verlauf der Endophthalmitis bei Inokulation antibiotisch vollemptfindlicher Keime. Dies deckt sich mit den Beobachtungen einer vorherigen Studie an der Augenklinik der LMU München. In einem tierexperimentellen Modell der Endophthalmitis konnte ein klinischer Unterschied zwischen koagulasenegativen Staphylokokken mit differentem Resistenzspektrum gezeigt werden. Der in diesen klinischen Studien beobachtete mögliche Zusammenhang zwischen der Antibiotikaresistenz der die Endophthalmitis verursachenden Keime und dem Schweregrad der Entzündung sollte Anlaß geben für weitere Untersuchungen im Bereich der Pathogenese der bakteriellen Genetik und Antibiotikaresistenz.

In der Literatur wurde vielfach über die Fähigkeit von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* und *Bacillus cereus* zur Produktion bestimmter Toxine und die damit korrelierende Virulenz bei der Endophthalmitis berichtet. Die Bedeutung der einzelnen *Staphylococcus epidermidis*-Stämme in einem ähnlichen Zusammenhang ist bisher noch nicht in Studien untersucht worden (Callegan et al., 1999; Jett et al., 1998; Booth et al., 1997; Jett et al., 1995; Stevens et al., 1992). An der Augenklinik der LMU München konnten bisher nur antibiotisch resistente *Staphylococcus epidermidis*-Stämme, dagegen nie vollemptfindliche Bakterien von Endophthalmitis-Patienten isoliert werden. Möglicherweise sind die resistenten Keime eher in der Lage, in den intraokularen Geweben Kolonien zu bilden, zu überleben, eine Gewebsschädigung oder eine deletäre immunologische Reaktion auf bakterielles Antigen hervorzurufen. Es stellt sich die Frage, ob diese Eigenschaften zusammen mit Resistenzplasmiden per Gen-Transfer übertragen werden. Vor diesem Hintergrund könnten geringere Keimzahlen der antibiotisch resistenten Stämme für die Entstehung einer Endophthalmitis ausreichen, um einen fulminanteren Entzündungsverlauf zu bedingen als empfindliche Keime. Resistenzplasmide sind bekannte Mediatoren der Antibiotikaresistenz. In der Literatur wurde der Transfer von Resistenzgenen von *Staphylococcus epidermidis* zu *Staphylococcus aureus* und umgekehrt beobachtet, wobei *Staphylococcus epidermidis*-Stämme als potentielles Reservoir für die entsprechenden Resistenzplasmide dienten. Es konnten sehr ähnliche Plasmide von *Staphylococcus aureus*- und *epidermidis*-Stämmen beschrieben werden (Forbes und

Schaberg, 1982). Punktmutationen, genetische Rekombinationen und lateraler Gentransfer gehören zu den unterschiedlichen genetischen Mechanismen, die Veränderungen in der Pathogenität von Mikroorganismen durch Expression veränderter Virulenzfaktoren bedingen können. Ein definierter Virulenzfaktor von *Staphylococcus epidermidis* ist das polysaccharide intercellular adhesin (PIA), welches als Mediator der interzellulären Adhäsion fungiert, und die Voraussetzungen für die Entstehung eines Biofilms oder Schleims schafft (Rupp et al., 1999). Dieser Schleim besteht aus Staphylokokkenzellen, eingehüllt in eine Matrix aus extrazellulären Polysacchariden. Die genaue Struktur dieser Polysaccharide und die Rolle eventuell vorhandener Proteine in dieser Schleimkapsel könnte für die Biotypisierung von Staphylokokken von Bedeutung sein, denn serologisch können verschiedene Kapseltypen von *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen unterschieden werden (Hancock, 1989). Lang et al. identifizierten 2000 ein neues Antigen von *Staphylococcus epidermidis*, das staphylococcal secretory antigen (SsaA). Dessen Expression könnte als möglicher Virulenzfaktor bei der Entstehung der *Staphylococcus epidermidis*-Endokarditis fungieren. Weiterhin wird angenommen, daß die Phasenvariation, die spontane Veränderung gewisser Bestandteile der Zelloberfläche, von pathogener Signifikanz ist. Phasenvarianten von Staphylokokkenspezies unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenz und Virulenz, welche nur teilweise mit bestimmten Virulenzfaktoren, z.B. der Schleimproduktion korreliert sind (Christensen et al., 1990). Die chemische Inhibition von Regulatoren, die für Induktion oder Phasenvariation verantwortlich sind, könnte nach deren Identifizierung eine neue Möglichkeit in der Bekämpfung von *Staphylococcus epidermidis*-assoziierten Infektionen mit Biomaterial darstellen (Rupp et al., 1999). Der Einsatz von molekulargenetischen Techniken, bei dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), erlaubt nicht nur eine sensitive und spezifische Identifikation von Mikroorganismen, sondern auch das Erkennen spezifischer Resistenzgene ( Schmitz et al., 1997). Frebourg et al. klassifizierten 2000 mittels PCR kontaminierende und infektiöse Stämme von *Staphylococcus epidermidis*. Dabei zeigte sich bei den infektiösen Stämmen dieser Spezies ein signifikant höheres Vorkommen von zwei bekannten Virulenzgenen, dem interzellulären Adhäsionsgen *ica* und *mecA*. Wenig ist bekannt über Wachstumsfaktoren, deren unterschiedliche Expression in Bakterienstämmen möglicherweise den Verlauf einer Entzündung beeinflussen kann. In der vorliegenden Studie sollten Erkenntnisse über die klinische Präsentation und Visusprognose einer experimentellen Endophthalmitis in Korrelation mit dem differentiellen Resistenzspektrum der *Staphylococcus epidermidis*-Stämme im Tiermodell gewonnen werden.

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, daß bezüglich des Verlaufs einer nicht therapierten experimentellen Endophthalmitis antibiotisch partiell- (PR) und multiresistente Stämme (MR) eine höhere Virulenz besitzen als vollsensible Stämme (VS). Die Netzhautfunktion, die elektrophysiologisch mittels Elektroretinographie (ERG) beurteilt wurde, blieb zu Beginn der Entzündung in den Gruppen VS und MR weitgehend unbeeinflusst, in der Gruppe PR hingegen zeigte sich eine deutliche funktionelle Reduktion. Im statistischen Vergleich stellte sich der Unterschied zwischen den Gruppen VS ( $p <$

0,001) und MR ( $p < 0,01$ ) und der Gruppe PR 12 Stunden nach Inokulation als signifikant heraus. Die ERG-Amplituden der Gruppe MR waren 12 Stunden nach Inokulation niedriger als in der Gruppe VS; es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. 30 Stunden nach Infektion der Kaninchenaugen konnte bei beiden Gruppen PR und MR keine Netzhautaktivität mehr registriert werden, wohingegen in der Gruppe VS mit noch 65 % der Normalantwort ein signifikant geringerer Grad der Netzhautschädigung verzeichnet werden konnte ( $p < 0,01$ ). Nach 72 Stunden hatten alle 3 experimentellen Gruppen ein Nulllinien-ERG. Die Elektoretinographie ergab insgesamt eine frühere und ausgeprägtere Reduktion der Netzhautfunktion durch die antibiotisch resistenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämme. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Bakterien der Gruppen PR und MR mit einer höheren Virulenz gegenüber den Keimen der Gruppe VS korreliert sind.

Der klinische Verlauf der experimentellen Endophthalmitis, induziert durch vollsensible koagulasenegative Staphylokokken, zeigte in einem frühen Stadium der Infektion ein deutlich milderes Entzündungsbild, verglichen mit der durch partiell- und multiresistente Bakterien hervorgerufenen Entzündungsreaktion. Somit lassen sich beim Vergleich der klinischen Befunde der einzelnen Gruppen die funktionellen Ergebnisse hinsichtlich Virulenz und Antibiotikaresistenzspektrum von *Staphylococcus epidermidis* bestätigen. Die ersten Zeichen einer intraokularen Entzündung nach Inokulation der Erreger konnten bei den Kaninchen der Gruppen PR und MR schon zu einem früheren Zeitpunkt als bei den Kaninchen der Gruppe VS beobachtet werden. Auch ergab sich insgesamt ein stärker ausgeprägtes Entzündungsgeschehen für die mit resistenten Stämmen von *Staphylococcus epidermidis*-assoziierte Endophthalmitis. Bei aggressiveren Verlaufsformen mit ausgeprägter Exsudation von Entzündungszellen und Fibrin in Vorderkammer und Glaskörper läßt sich deren Korrelation mit dem Schweregrad der Netzhautschädigung oftmals durch alleinige klinische Untersuchung nur schwer feststellen. Aufgrund der Variabilität der klinischen Manifestation der Endophthalmitis im Bereich der vorderen Augenabschnitte, insbesondere der Vorderkammerreaktion, ist die Aussagekraft der klinischen Beurteilung hinsichtlich des Schweregrades und der Prognose einer Endophthalmitis im experimentellen Kaninchenmodell limitiert.

Die Ergebnisse der histopathologischen Analyse bestätigten den im ERG beobachteten Trend. 5 Tage nach Inokulation der Erreger präsentierten sich die Gruppen PR und MR mit einem ausgeprägteren Bild der Netzhautdestruktion während die Gruppe VS in allen untersuchten anatomischen Regionen der Netzhaut mit einer geringeren Schädigung einherging.

Der evaluierte Score für die Beurteilung der Entzündungsreaktion im gefärbten histologischen Schnittbild war in der Gruppe VS niedriger als in den Gruppen PR und MR und deckte sich so mit den Beobachtungen im ERG und bei der klinischen Untersuchung. Um kein mögliches lokalisiertes Entzündungsareal zu übersehen, wurden 3 verschiedene anatomische Lokalisationen der nasalen- und temporalen Hemisphäre der Netzhaut

begutachtet. Insgesamt zeigten alle Augen der experimentellen Gruppen das histologische Bild einer eher diffusen als lokalisierten Entzündung. Obwohl in der Literatur verschiedene Einteilungsschemata für die histopathologische Evaluierung existieren (Maxwell et al., 1991; Aguilar et al., 1996), bietet das in dieser Studie verwendete Graduierungssystem eine detailliertere Beschreibung der Entzündung in den jeweiligen anatomischen Strukturen des Auges.

Die histopathologische Beurteilung der Hornhaut und des Limbus ergab gegenüber dem hinteren Augenabschnitt eine geringer ausgeprägte Entzündungsreaktion. Dies läßt sich möglicherweise mit der Inokulation der Erreger in die Glaskörpermitte und die damit verbundene stärkere lokale inflammatorische Reaktion auf antigenes bakterielles Material erklären. Weiterhin konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Irisvaskularisierung festgestellt werden, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß die Hyperämie der Irisgefäße einen höheren Stellenwert im Rahmen der Immunantwort einnimmt als die Neubildung von Gefäßen. Da die Vasodilatation der Irisgefäße bei der histologischen Evaluierung nicht berücksichtigt wurde, ergaben sich diesbezüglich keine Unterschiede in der histologischen Analyse der Irismorphologie. Bei der Auswertung der Infiltration des Ziliarkörpers mit Entzündungszellen und der Anzahl der die Glaskörperbasis infiltrierenden inflammatorischen Zellen konnte eine recht gute Übereinstimmung mit dem histologischen Score der Netzhaut gefunden werden.

In dieser experimentellen Studie im phaken Tiermodell der Endophthalmitis müssen limitierende Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen ist es schwierig, den inflammatorischen Verlauf und die fortschreitende Glaskörpertrübung im Rahmen der Endophthalmitis klinisch zu beurteilen. In dieser Studie wurden zwei *Staphylococcus epidermidis*-Laborstämme mit vier *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen, die von Endophthalmitis-Patienten der Augenklinik München isoliert wurden, miteinander verglichen. Laborstämme verlieren während ihrer Passagierung Virulenzfaktoren. Dies kann ebenso bei den von Patienten isolierten Keimen angenommen werden, die auch durch mehrfache Isolierung eine Passagierung bis zum Zeitpunkt der Inokulation durchmachen. Die elektrophysiologische Untersuchung ergab 12 Stunden nach Inokulation der Bakterien für die Gruppe MR einen höheren b-Wellen-Quotienten gegenüber der Gruppe PR bei einer niedrigeren ERG-Amplitude gegenüber der Gruppe VS. Der Unterschied zwischen den Gruppen MR und PR stellte sich als statistisch nicht signifikant heraus. Bei der Interpretation der in dieser Studie elektrophysiologisch gewonnenen Ergebnisse müssen mögliche Schwankungen bei der Ableitung des ERGs sowie die geringe Fallzahl berücksichtigt werden. Dennoch, 30 Stunden nach Infektion ergab sich sowohl für die Gruppen VS und PR als auch für die Gruppen VS und MR ein signifikanter Unterschied. Insgesamt erweist es sich als schwierig, bei der Anwendung von Tiermodellen Befunde und Daten auf das menschliche Auge zu übertragen.

Immunologische Mechanismen sowie die jeweilige Expression bestimmter Virulenzfaktoren und potentiell pathogene Eigenschaften wie Adhäsion oder Toxinproduktion der Bakterienspezies selbst, können in den unterschiedlichen Wirtszellen

oder Wirtsgewebe von Mensch und Tier Unterschiede zeigen. Zudem kommt es während Kataraktoperationen zu einem Eintritt der Keime in die Vorderkammer, die von dort aus in den Glaskörper penetrieren. In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurden die Erreger direkt über die Pars plana des Auges intravitreal inokuliert. Durch den unterschiedlichen Eintrittsweg können sich neben einer veränderten Antigen-spezifität auch zeitliche Differenzen in der immunologischen Reaktion auf die Keime ergeben. Der Glaskörper stellt zudem ein geeigneteres Medium für bakterielles Wachstum dar als die Vorderkammer (Mandelbaum und Forster, 1995). Diesbezüglich ist der Entzündungsverlauf in dem vorliegenden experimentellen Modell nur eingeschränkt bewertbar. Da sich aber klinisch prospektive Studien am menschlichen Auge kaum durchführen lassen, wird man vorwiegend auf tierexperimentelle Modelle angewiesen sein.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß antibiotisch resistente Stämme von *Staphylococcus epidermidis* die Tendenz zeigen, eine frühere und stärker ausgeprägte Entzündungsreaktion als quantitativ gleiche Keimzahlen von antibiotisch sensiblen Stämmen im experimentellen Endophthalmitismodell hervorzurufen. Dieser Trend konnte in der vorliegenden Studie sowohl elektrophysiologisch als auch histopathologisch demonstriert werden. Die Bedeutung von Antibiotikaresistenzspektrum und Virulenz der koagulasenegativen Staphylokokken bei der Endophthalmitis sollte Gegenstand weiterer Studien sein und hinsichtlich einer präziseren Beschreibung der klinischen Symptomatik mit bildgebenden Techniken wie Ultraschall-Sonographie, Magnetresonanztomographie oder Computertomographie korreliert werden. Die in dieser Studie gewonnenen ERG-Daten deuten darauf hin, daß in den ersten 12 Stunden nach erfolgter Inokulation der Erreger mit einem Beginn der Netzhautschädigung gerechnet werden muß. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich für jeden Ophthalmologen die Konsequenz, so früh wie möglich, bereits am ersten postoperativen Tag nach intraokularer Chirurgie, auf mögliche Infektionszeichen zu achten, um so einen drohenden Visusverlust des Auges durch Verzögerungen in der Therapieeinleitung zu vermeiden. Neben der Infektionsprophylaxe sollten in diesem Zusammenhang noch einmal die Rolle der schnellen und exakten mikrobiologischen Diagnostik mittels Kultur und Mikroskopie mit Identifikation des Antibiotikaresistenzspektrums und der daraus resultierende gezielte Einsatz von Antibiotika bei der Endophthalmitis sowie die Bedeutung der Vitrektomie hervorgehoben werden. Vor allem bei postoperativen Endophthalmitiden durch *Staphylococcus epidermidis* ist mit dem Vorkommen von Multiresistenzen gegen Aminoglykoside, Makrolide, Penicillin und in einzelnen Fällen auch gegen Cefotaxim und Cefalexin zu rechnen. Hier ist das rasche Vorliegen der Ergebnisse aus der Resistenztestung entscheidend für die adäquate Modifizierung der Therapie (Miño de Kaspar et al., 1993). Wegen der besonderen Gefahr für die Funktion und Integrität des Auges, liegen zahlreiche Publikationen zu dieser schwerwiegenden postoperativen Komplikation vor. Dennoch gibt es bisher keine klaren Erkenntnisse über genetische und molekulare Eigenschaften der koagulasenegativen Staphylokokken sowie kleiner Kolonie-Varianten bezüglich Resistenzmuster, der Fähigkeit zur Resistenzübertragung und der Rolle bestimmter genetischer Faktoren in der Entstehung

der Endophthalmitis. Um genauere Erkenntnisse über die Zusammenhänge von Virulenz und Antibiotikaresistenzspektrum von *Staphylococcus epidermidis* hinsichtlich der beobachteten Unterschiede im Schweregrad der intraokularen Entzündung und Gewebeschädigung zu gewinnen, sollten zur weiteren Charakterisierung auf Speziesebene Studien auf molekularbiologischer Basis folgen.

## E. Zusammenfassung

Die akute postoperative Endophthalmitis stellt eine seltene, aber die Funktion und die Integrität des Auges bedrohende Komplikation nach ophthalmochirurgischen Eingriffen, meist Katarakt-Operation, dar. Häufig wird *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen.

Für die Visusprognose entscheidend sind eine prompte Diagnose und schnellstmögliche Therapieeinleitung, um eine rasche Beseitigung der Erreger und Suppression der Immunantwort zu erreichen.

Für die gezielte Therapie einer *Staphylococcus epidermidis*-assoziierten Endophthalmitis ist die Identifikation des entsprechenden Resistenzspektrums von besonderer Bedeutung, da in letzter Zeit zunehmend Resistenzentwicklungen dieser Spezies beobachtet wurden. Der genaue Zusammenhang zwischen Virulenz und Antibiotikaresistenzmuster der koagulasenegativen Staphylokokken ist bisher unklar. Unsere Hypothese, die auf dem klinischen Eindruck bei der Versorgung von Endophthalmitis-Patienten in unserer Klinik basiert, besagt, daß resistente Keime einen schwereren Krankheitsverlauf der Endophthalmitis induzieren, und dieser somit auf einer höheren Pathogenität dieser Erreger beruhen könnte. Es liegen bisher keine Daten über das funktionelle und histopathologische Erscheinungsbild einer experimentellen Endophthalmitis in Abhängigkeit von den Resistenzcharakteristika der jeweiligen Erreger vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem Tiermodell Unterschiede im klinischen und funktionellen Verlauf sowie im histopathologischen Bild einer experimentellen Endophthalmitis untersucht, die durch antibiotisch unterschiedlich empfindliche *Staphylococcus epidermidis*-Stämme hervorgerufen wurden.

Die Beobachtung des klinischen Verlaufs der Endophthalmitis ergab keine deutlichen Unterschiede im Schweregrad der Erkrankung bezüglich des vorderen Augenabschnitts. Jedoch konnten in Hinblick auf den Zeitpunkt der Funduseintrübung Differenzen zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen aufgezeigt werden. Im Verlauf der experimentell induzierten Endophthalmitis kam es bei den partiell- und multiresistenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen zu einem früheren Zeitpunkt zu einer stärker ausgeprägten Entzündung und zu einer früheren Eintrübung des Glaskörperaumes durch Infiltration bis hin zum Verlust des roten Fundusreflexes als bei den vollempfindlichen *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen.

12 Stunden nach Inokulation der Bakterien zeigte sich in den mit partiellresistenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen infizierten Augen ein im Vergleich zur normalen Netzhautfunktion signifikant erniedrigtes ERG. Die mit vollsensiblen und multiresistenten Stämmen inokulierten Endophthalmitis-Augen waren dieser Gruppe hinsichtlich des Erhalts der Netzhautfunktion signifikant überlegen. 30 Stunden nach Infektion konnte lediglich in den mit vollsensiblen Bakterien inokulierten Augen eine elektroretinographische Antwort der Netzhaut registriert werden.

Die histopathologische Analyse trug zu der klinischen und funktionellen Beobachtung bei, daß hinsichtlich des Entzündungsgrades aller untersuchten Gewebe des Auges ein milderes

Bild der Endophthalmitis in den mit vollemmpfindlichen Keimen infizierten Augen und eine deutlichere Desintegration der anatomischen Strukturen in den mit resistenten *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen infizierten Augen resultierte.

Aus dem Vergleich der klinischen, histopathologischen und elektrophysiologischen Daten ergibt sich der Eindruck, daß in einem experimentellen Tiermodell einer nicht therapierten Endophthalmitis Resistenzen bei *Staphylococcus epidermidis* mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert sind. Die Studie zeigt, daß antibiotisch vollemmpfindliche Keime einen milderen Verlauf der Entzündung induzieren als partiell- und multiresistente Stämme von *Staphylococcus epidermidis*. Somit scheint die Schlußfolgerung gerechtfertigt, daß die spezifische Virulenz von *Staphylococcus epidermidis* mit dem Antibiotikaresistenzspektrum der einzelnen Stämme korreliert werden kann.

## F. Literaturverzeichnis

1. Aaberg, TM, Flynn HW, Scheffman J, Newton J. Nosocomial Acute-onset Postoperative Endophthalmitis Survey. *Ophthalmology* 1998;105:1004-1010
2. Aguilar HE, Meredith TA, Drews C, Grossniklaus H, Sawant AD, Gardner S. Comparative treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121:310-317
3. Archer GL. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Douglas RG and Bennett JE. Principles and Practice of Infectious Diseases, 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990; 174:1511-1518
4. Ariyasu RG, Nakamura T, Trousdale MD, Smith RE. Intraoperative bacterial contamination of the aqueous humor. *Ophthalmic Surg* 1993; 24:367-74
5. Bannermann TL, Rhoden DL, McAllister SK, Miller JM, Wilson LA. The source of coagulase-negative staphylococci in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A comparison of eyelid and intraocular isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Arch Ophthalmol* 1997;115:357-361
6. Binder C, Miño de Kaspar H, Engelbert M, Klauss V, Kampik A. Bakterielle Keimbeseidlung der Konjunktiva mit *Propionibacterium acnes* vor und nach Polyvidon-Jod-Applikation vor intraokulären Eingriffen. *Ophthalmologe* 1998;95:438-441
7. Bornfeld N, Wessing A. Erkrankungen der Netzhaut. In: Axenfeld T, Pau H, (eds.). Lehrbuch der Augenheilkunde. 13. Aufl., Stuttgart, New York, Jena: Gustav-Fischer-Verlag, 1992;385-386
8. Brakstad OG, Maeland JA. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS* 1997;105:264-276
9. Breitbach R, Spitznas M. Perioperative Infektionsgefahr in der Kataraktchirurgie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1991;198:94-98
10. Brod RD, Flynn HW Jr. Infectious endophthalmitis. *Cur Op Infect Dis* 1997;10:153-162
11. Burk A, Burk R. Checkliste Augenheilkunde. 2. Aufl., Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag, 1999
12. Christensen GD, Baddour LM, Madison BM, Parisi JT, Abraham S, Hasty DL, Lowrance JH, Josephs JA, Simpson WA. Colonial morphology of staphylococci on Memphis agar: phase variation of slime production, resistance to beta-lactam antibiotics, and virulence. *J Infect Dis* 1990;161:1152-1169
13. Coudron PE, Jones DL, Dalton HP, Archer GL. Evaluation of laboratory tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 1986;24:764-769
14. D'Amico DJ, Caspers-Velu L, Libert J, Shanks E, Schrooyen M, Hanninen BS, Kenyon KR. Comparative toxicity of intravitreal aminoglycoside antibiotics. *Am J Ophthalmol* 1985;100:264-275
15. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. Microbiologic factors and visual outcome in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. *Am J Ophthalmol* 1996;122:830-846
16. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 1995;113:1479-1496

17. Engelbert M. Prophylaxe und Management der Endophthalmitis im tierexperimentellen Modell mit *Staphylococcus aureus*. Medizinische Doktorarbeit der LMU München, 1997
18. Fechner PU, Teichmann KD. Endophthalmitis. In: Medikamentöse Augentherapie. 4. Aufl., Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag, 2000;20:439-459
19. Forbes BA, Schaberg DR. Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*. Evidence for conjugative exchange of resistance. J Bacteriol 1983;153:627-634
20. Forster RK. Endophthalmitis. In: Duane TD, Jaeger EA, (eds). Duane's Clinical Ophthalmology, revised ed. Philadelphia: Harper & Row, 1984;vol 4, chap 24,1-21
21. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J Clin Microbiol 2000;38:877-880
22. Grasbon T, Miño de Kaspar H, Klauss V. Koagulasenegative Staphylokokken auf der blanden und chronisch entzündeten Bindehaut. Ophthalmologe 1995;92:793-801
23. Haas A. Zur Frage der Selektion koagulasenegativer Staphylokokken unter Kolonisationsprophylaxe. Dissertation der LMU München, 1994
24. Han DP, Wisniewski SR, Wilson LA, Barza M, Vine AK, Doft BH, Kelsey SF. Spectrum and susceptibilities of microbiologic isolates in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. Am J Ophthalmol 1996;122:1-17
25. Hancock IC. Encapsulation of coagulase-negative staphylococci. Zentralbl Bakteriologie 1989;272:11-18
26. Hassan IJ. Endophthalmitis—problems, progress and prospects. J Antimicrob Chemother 1994;33:383-386
27. Hassan IJ, MacGowan AP, Cook SD. Endophthalmitis at the Bristol Eye Hospital. An 11-year review of 47 patients. J Hosp Infect 1992;22:271-278
28. Heaven CJ, Mann PJ, Boase DL. Endophthalmitis following extracapsular cataract surgery. A review of 32 cases. Br J Ophthalmol 1992;76:419
29. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. Annu Rev Med, 1999;50:223-236
30. Johnson MW, Doft BH, Kelsey SF, Barza M, Wilson LA, Barr CC, Wisniewski SR. The Endophthalmitis Vitrectomy Study. Relationship between clinical presentation and microbiologic spectrum. Ophthalmology 1997;104:261-272
31. Jones DB. Emerging antibiotic resistance. Real and relative. Arch Ophthalmol 1996 ;114:91-92
32. Kampik A, Heidenkummer HP. Management of acute endophthalmitis. The european standpoint. In: Bialasiewicz AA, Schaal KP, (eds). Update on Infectious Diseases of the Eye. Nosocomial Infections. Buren, the Netherlands: Aeolus Press, 1994;325-331
33. Kanski JJ. Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie. 2. Aufl., New York: Georg-Thieme Verlag, 1996
34. Kato T, Hayasaka S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from conjunctivas of preoperative patients. Jpn J Ophthalmol 1998;42:461-465
35. Kattan HM, Flynn HW, Pflugfelder SC, Robertson C, Forster RK. Nosocomial endophthalmitis survey. Current incidence of infection after intraocular surgery. Ophthalmology 1991;98:227-238
36. Klauss V, Miño de Kaspar H, Kampik A. Endophthalmitis. In: Kampik A, Grehn F., (eds). Bücherei des Augenarztes. Stuttgart: Ferdinand-Enke-Verlag, 1998;138:122-128

37. Kloos WE, Lambe DW. *Staphylococcus*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds). *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1991;28:222-237
38. Krieglstein GK, Jonescu-Cuypers CP, Severin M. *Atlas der Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1999;11:234-236
39. Lang S, Livesley MA, Lambert PA, Littler WA, Elliott TS. Identification of a novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. *Immunol Med Microbiol* 2000;29:213-220
40. Lee WR. *Ophthalmic Histopathology*. London: Springer-Verlag, 1993;6:128-133
41. Loewenstein A, Zemel E, Lazar M, Perlman I. The effects of Depo-Medrol preservative on the rabbit visual system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:3053-3060
42. Lohmann CP, Linde HJ, Reischl U. Die Schnell Diagnostik einer infektiösen Endophthalmitis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Eine Ergänzung zu den konventionellen mikrobiologischen Diagnostikverfahren. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997;211:22-27
43. Looney WJ. Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci* 2000;57:317-322
44. Lund OE, Kampik A. Vitrektomie bei Endophthalmitis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1983;182:30-35
45. Lütticken R, Otte HJ. Die Familie der Micrococcaceae. In: Brandis H, Otte HJ (eds.). *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. 5. Aufl., Stuttgart, New York: Gustav-Fischer-Verlag, 1984;361-367
46. Mao LK, Flynn HW Jr, Miller D, Pflugfelder SC. Endophthalmitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Am J Ophthalmol* 1993;116:584-589
47. Mandelbaum S, Forster RK. Exogenous endophthalmitis. In: Pepose Js, Holland GN, Wilhelmus KR, (eds). *Ocular Infection and Immunity*. St. Louis: Mosby, 1995;93:1298-1317
48. McNamara PJ, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:117-122
49. Meredith TA, Trabelsi A, Miller MJ, Aguilar E, Wilson LA. Spontaneous sterilization in experimental *Staphylococcus epidermidis* Endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:181-186
50. Miño de Kaspar H, Grasbon T, Kampik A. Automated surgical equipment requires routine disinfection of vacuum control manifold to prevent postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology* 2000;107:685-690
51. Miño de Kaspar H, Kollmann M, Klauss V. Endophthalmitis. Bedeutung mikrobiologischer Untersuchungen für Therapie und Prognose. *Ophthalmologie* 1993;90:726-736
52. Miño de Kaspar H, Neubauer AS, Molnar A, Hoepfner AS, Ta CS, Grasbon T, Engelbert M, Thiel M, Klauss V, Kampik A. Rapid direct antibiotic susceptibility testing in endophthalmitis. *Ophthalmology* 2002;109:687-693
53. Moschos M, Grigoras G, Panagakis E, Kontogeorgos G, Zafiroopoulos N, Brouzas D. ERG and electron microscopic findings after intravitreal use of aminoglycosides. *Ann Ophthalmol* 1990;22:255-262
54. Mosher RH, Vining LC. Antibiotic resistance. In: Lederberg J (ed). *Encyclopedia of Microbiology* 1992;1:97-106
55. Newell FW. Intraocular inflammations. In: Newell FW (ed). *Ophthalmology. Principles and concepts*. 7th ed., Mosby-Year Book, 1992;19:327-330

56. O'Day DM, Jones DB, Patrinely J, Elliot JH. *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis. Visual outcome following noninvasive therapy. *Ophthalmology* 1982; 89:354-360
57. Okada AA, Johnson RP, Liles WC, D'Amico DJ, Baker AS. Endogenous bacterial endophthalmitis. Report of a ten-year retrospective study. *Ophthalmology* 1994;101:832-838
58. Ormerod LD, Becker LE, Cruise RJ, Grohar HI, Paton BG, Frederick AR, Topping TM, Weiter JJ, Buzney SM, Baker AS. Endophthalmitis caused by the coagulase-negative staphylococci. 2. Factors influencing presentation after cataract surgery. *Ophthalmology* 1993;100:724-729
59. Ormerod LD, Ho DD, Becker LE, Cruise RJ, Grohar HI, Paton BG, Frederick AR, Topping TM, Weiter JJ, Buzney SM. Endophthalmitis caused by the coagulase-negative staphylococci. 1. Disease spectrum and outcome. *Ophthalmology* 1993;100:715-723
60. Özer-Arasli A, Schwenn O, Dick B, Pfeiffer N. Endophthalmitis nach Kataraktchirurgie. Langzeitverlauf. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997;211:178-182
61. Pelletier LL Jr, Richardson M, Feist M. Virulent gentamicin-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Lab Clin med* 1979;94:324-334
62. Pleyer U, Mondino BJ, Adamu SA, Pitchejian-Halabi H, Engstrom RE, Glasgow BJ. Immune response to *staphylococcus epidermidis*-induced endophthalmitis in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2650-2663
63. Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis* 1994;3:302-312
64. Proctor RA, Kahl B, von Eiff C, Vaudaux PE, Lew DP, Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 1998;27:68-74
65. Proctor RA, Peters G. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis* 1998;27:419-422
66. Quie PG, Belani KK. Coagulase-negative staphylococcal adherence and persistence [review]. *J Infect Dis* 1987;156:543-547
67. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infectio in a rat model. *Infect Immun* 1999;67:2656-2659
68. Schmidseeder E, Miño de Kaspar H, Klauss V, Kampik A. Posttraumatische Endophthalmitis nach penetrierenden Augenverletzungen. Risikofaktoren, mikrobiologische Diagnostik und funktionelle Ergebnisse. *Ophthalmologie* 1998;95:153-157
69. Schmidt H, Schlöricke E, Fislage R, Schulze HA, Guthoff R. Effect of surface modifications of intraocular lenses on the adherence of *Staphylococcus epidermidis*. *Zentrabl Bakteriol* 1998;287:135-145
70. Schmitz FJ, Mackenzie CR, Hofmann B, Verhoef J, Finken-Eigen Heinz HP, Kohrer K. Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR. *J Med Microbiol* 1997;46:773-778
71. Scott IU, Flynn HW Jr, Feuer W. Endophthalmitis after secondary intraocular lens implantation. A case-control study. *Ophthalmology* 1995;102:1925-1931
72. Singleton P. Einführung in die Bakteriologie. Wiesbaden: Quelle & Meyer-Verlag, 1995

73. Smith MA, Sorenson JA, Lowy FD, Shakin JL, Harrison W, Jakobiec FA. Treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis with intravitreal vancomycin. *Ophthalmology* 1986;93:1328-1335
74. Somani S, Grinbaum A, Slomovic AR. Postoperative endophthalmitis. Incidence, predisposing surgery, clinical course and outcome. *Can J Ophthalmol* 1997;32:303-310
75. Speaker MG, Menikoff JA. Postoperative endophthalmitis. Pathogenesis, prophylaxis, and management [review]. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:51-70
76. Speaker MG, Milch FA, Shah MK, Eisner W, Kreiswirth BN. Role of external bacterial flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology* 1991;98:639-649; discussion 650
77. Sunaric-Mégevand G, Pournaras CJ. Current approach to postoperative endophthalmitis [review]. *Br J Ophthalmol* 1997;81:1006-1015
78. Thompson WS, Rubsamen PE, Flynn HW Jr, Schiffman J, Cousins SW. Endophthalmitis after penetrating trauma. Risk factors and visual acuity outcomes. *Ophthalmology* 1995;102:1696-1701
79. Vesga O, Groeschel MC, Otten MF, Brar DW, Vann JM, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis* 1996;173:739-742
80. Von Eiff, Vaudaux P, Kahl BC, Lew D, Emler S, Schmidt A, Peters G, Proctor RA. Bloodstream infections caused by small-colony variants of coagulase-negative staphylococci following pacemaker implantation. *Clin Infect Dis* 1999;29:932-934
81. Wilson FM. Causes and prevention of endophthalmitis. *Int Ophthalmol Clin* 1987;27:67-73
82. Zemel E, Loewenstein A, Lei B, Lazar M, Perlman I. Ocular pigmentation protects the rabbit retina from Gentamicin-induced toxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1875-1884

## **G. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. A. Kampik möchte ich an erster Stelle für die Überlassung des Themas und die wohlwollende Unterstützung dieser Dissertation danken.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. rer. nat. H. Miño de Kaspar. Sie vermittelte mir den Zugang zur Mikrobiologie und hat durch ihr außerordentliches Fachwissen und ihre stets aufmunternde, intensive und engagierte Betreuung diese Arbeit erst ermöglicht.

Martina Mette hat großen Anteil an dem Gelingen dieser Studie. Die enge und kollegiale Zusammenarbeit hat den experimentellen Teil der Arbeit erheblich erleichtert.

Herrn Dr. M. Thiel danke ich für die kompetente Hilfestellung bei der Ausarbeitung des histopathologischen Teils dieser Dissertation.

Mein Dank gilt auch der Hannelore-Zimmermann-Stiftung für die Förderung dieser Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. V. Klauß für seine Teilnahme und Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich Herrn Prof. F. Stefani und dem Team des Histologielabors für die Hilfestellung bei dem histopathologischen Teil dieser Arbeit und Frau G. Lengersdorff und Frau L. Merz vom Fotolabor für die Fertigstellung der Bilddokumente.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Großeltern für die liebevolle Unterstützung meines Studiums.

## H. Lebenslauf

3. Mai 1971	Geburt in Braunschweig
Mai 1991	Abitur am Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium in Celle
1992-1993	Freiwilliges soziales Jahr
1993	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
1997/98	Experimenteller Teil der Doktorarbeit an der Augenklinik der LMU München und im „Departamento de Salud del Gobierno de Navarra“, Instituto de Salud Publica, Pamplona, Spanien
1999-2000	Praktisches Jahr an der LMU München und Tulane University School of Medicine, New Orleans, USA
Mai 2000	Dritte ärztliche Prüfung an der LMU München
Juli 2000-Dezember 2001	Ärztin im Praktikum an der Augenklinik der LMU München
seit Januar 2002	Assistenzärztin an der Augenklinik der LMU München