



Wirt – Pathogen Interaktion bei Hornhautinfektionen durch
Fusarium spp.

Host – Pathogen Interaction in Keratitis caused by
Fusarium spp.

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität.

Vorgelegt von

Thorsten Manfred Koch

aus

Böblingen.

Würzburg 2023



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai

2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	<i>Fusarium</i> spp.	5
3.2	Morphologie von <i>Fusarium</i> spp.	6
3.3	Kontaktlinsenassoziierte Infektionen des Auges durch <i>Fusarium</i> spp.	7
3.4	<i>Fusarium</i> spp. assoziierte Augeninfektionen in Deutschland.....	8
3.5	<i>Fusarium</i> spp. assoziierte Augeninfektionen in Indien	9
3.6	Resistenzmechanismen von <i>Fusarium</i> spp. gegen Antimykotika	9
3.7	Durch <i>Fusarium</i> spp. ausgelöste Immunreaktion am Auge	9
3.8	Die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei <i>Fusarium</i> -Infektionen des Auges	12
3.9	Korneamodelle für den experimentellen Einsatz	13
4	Zielsetzung	14
5	Material	15
5.1	Verwendete Pilzstämme	15
5.2	Kulturmedien zur Anzucht der Pilzstämme.....	16
5.3	Epithelzelllinien in den verwendeten Infektionsmodellen.....	17
5.4	Zelllinien, Zellkulturmedien und Zusätze	17
5.5	Kontaktlinsenreinigungslösungen	18
5.6	Kontaktlinsen	18
5.7	Chemikalien.....	19
5.8	Technische Geräte	20
5.9	Software	20
6	Methoden	21
6.1	Bestimmung der Zell- und Konidienzahl.....	21
6.2	Pilzkultivierung.....	21
6.3	Zellkultivierung.....	21
6.3.1	Kultivierung der humanen Pharynxkarzinomzellen FaDu (ATCC® HTB-43™).....	21
6.3.2	Kultivierung der humanen Korneaepithelzellen HCE-2 [50.B1] (ATCC® CRL-11135™).....	22
6.4	Untersuchung des Verhaltens von <i>F. falciforme</i> und <i>F. petroliphilum</i> in KL-Kombilösungen.....	22
6.4.1	Nächtliche Inkubation von <i>F. falciforme</i> und <i>F. petroliphilum</i> auf KL.....	22

6.4.2	Ermittlung der Keimrate und der durchschnittlichen Keimschlauchlänge von <i>F. falciforme</i> und <i>F. petroliphilum</i> durch FITC-Färbung	23
6.4.3	Untersuchung der KL-Kombilösungen und <i>F. falciforme</i> und <i>F. petroliphilum</i> nach der DIN EN ISO 14729 – „Stand Alone Test“	24
6.5	Biofilmbildung von <i>F. falciforme</i> und <i>F. petroliphilum</i> auf KL	26
6.5.1	Biofilmbildung in SAB.....	26
6.5.2	Biofilmbildung in KL-Kombilösungen	27
6.6	Zytotoxizitätsbestimmung durch LDH-Freisetzung im Infektionsmodell.....	27
6.6.1	LDH-Freisetzung durch die Pharynxkarzinomzellen.....	29
6.6.2	LDH-Freisetzung durch die Korneaepithelzellen	29
6.7	IL-8 Freisetzung der Korneaepithelzellen im Infektionsmodell.....	30
6.8	Auswertung der Versuche.....	30
7	Ergebnisse	31
7.1	Unterschiedliche Wirksamkeit der KL-Kombilösungen	31
7.1.1	Inkubation von <i>Fusarium</i> spp. in KL-Kombilösungen über Nacht.....	31
7.1.2	Beurteilung der Keimrate und der durchschnittlichen Keimschlauchlänge durch FITC-Färbung.....	33
7.1.3	Untersuchung der KL-Kombilösungen und <i>Fusarium</i> -Isolaten nach der DIN EN ISO 14729 – „Stand Alone Test“	37
7.2	Biofilmbildung von <i>Fusarium</i> spp. auf Kontaktlinsen	39
7.2.1	Biofilmbildung auf KL C in Sabouraud-Glucose-Bouillon.....	39
7.2.2	Keine Biofilmbildung auf KL in KL-Kombilösungen.....	40
7.3	LDH-Freisetzung im Epithelzellmodell durch <i>Fusarium</i> spp.	41
7.3.1	Kein Unterschied bei der Zytotoxizität zwischen <i>F. petroliphilum</i> und <i>F. falciforme</i> gegenüber Pharynxkarzinomzellen.....	41
7.3.2	Kein Unterschied bei der Zytotoxizität zwischen <i>F. petroliphilum</i> und <i>F. falciforme</i> gegenüber Korneaepithelzellen	41
7.4	Keine unterschiedliche IL-8-Freisetzung durch Korneaepithelzellen nach Koinkubation mit <i>F. petroliphilum</i> und <i>F. falciforme</i>	43
8	Diskussion	44
8.1	Ineffektivität der KL-Kombilösung A gegen <i>Fusarium</i> spp.	44
8.2	FITC-Färbung vs. DIN EN ISO 14729 zum Screening von KL-Reinigungslösungen	46
8.3	Kein Nachweis von Biofilmbildung auf KL nach Inkubation in KL-Kombilösung.....	48
8.4	Messbare Zellschädigung durch <i>Fusarium</i> spp. in Infektionsmodellen.....	48

8.5	IL-8 Ausschüttung durch <i>Fusarium</i> spp. in den Infektionsmodellen unter aeroben Bedingungen	50
8.6	Kein physiologischer Unterschied zwischen <i>F. petroliphilum</i> und <i>F. falciforme</i> messbar.....	51
9	Zusammenfassung und Ausblick.....	53
10	Literaturverzeichnis.....	55
11	Anhang.....	59
11.1	Abkürzungsverzeichnis	59
11.2	Tabellenverzeichnis	61
11.3	Abbildungsverzeichnis	62
11.4	Eidesstattliche Erklärung	63
11.5	Danksagung	64
11.6	Lebenslauf	65

1 Zusammenfassung

Fusarium (*F.*)-Infektionen des Auges zeigen oft einen schwerwiegenden Verlauf und sind am häufigsten mit Spezies (Spp.) des *Fusarium solani* species complex (FSSC) assoziiert (van Diepeningen et al., 2014, Walther et al., 2017, Walther et al., 2018). Dabei sind das Tragen von weichen Kontaktlinsen (KL) sowie Traumata die wichtigsten prädisponierenden Faktoren (Gaujoux et al., 2008, Thomas and Kaliyamurthy, 2013, Ong et al., 2016, Bourcier et al., 2017). Vorangegangene Untersuchungen des Nationalen Referenzzentrums für invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) hatten ergeben, dass Infektionen durch *F. petroliphilum* mit der Nutzung von KL, Infektionen durch *F. falciforme* jedoch überwiegend traumaassoziiert und vor allem aus tropischen und subtropischen Ländern bekannt sind (Walther et al., 2018). Dieses gegensätzliche Verhalten der Spp. könnte durch Unterschiede in Habitat und geographischer Verbreitung oder durch physiologische Unterschiede wie Keimrate, Wachstumsgeschwindigkeit, Toleranz gegen Desinfektionsmittel, Biofilmbildung oder Zytotoxizität verursacht sein (Walther et al., 2018).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob *F. falciforme* und *F. petroliphilum* physiologische Merkmale aufweisen, die für die Unterschiede in den Risikofaktoren für Keratitiden durch die beiden Arten verantwortlich sein könnten.

Dazu wurden die Keimrate der Konidien und die Länge der Keimschläuche beider *Fusarium* spp. mittels Fluoresceinisothiocyanate (FITC)-Färbung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in KL-Kombilösungen bei Raumtemperatur (RT) dargestellt. Um das Verhalten der Konidien gegenüber drei verschiedener KL-Kombilösungen, die zum Zeitpunkt der Untersuchungen in Deutschland erhältlich waren, weiter zu untersuchen, wurde ein standardisierter Zulassungstest für KL-Kombilösungen durchgeführt. Weiterhin wurde die Toleranz der Pilze gegenüber verschiedenen KL-Kombilösungen unter realitätsnahen Bedingungen durch Inkubation der Konidien in KL-Kombilösungen mit KL über Nacht untersucht.

Die Fähigkeit der Biofilmbildung wurde durch Aufbringen der Konidien auf KL verschiedener Hersteller in Sabouraud-Dextrose-Bouillon (Sab-Bouillon) und diversen KL-Kombilösungen beurteilt.

Die *in vitro* Zytotoxizität der Konidien gegenüber humanen Korneaepithelzellen (HCE) wurde mit Hilfe eines Korneaepithelzellmodells unter aeroben und mikroaerophilen Bedingungen über die Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Freisetzung von HCE indirekt gemessen. Eine Aussage zur Immuninduktion war nach der Messung von Interleukin (IL)-8 in den Überständen der Infektionsmodelle möglich.

Nach der nächtlichen Inkubation der Konidien in KL-Kombilösungen, wurde in einer der drei Kombilösungen für alle *F. petroliphilum*-Isolate eine geringere Keimfähigkeit als für die *F. falciforme*-Isolate festgestellt. Bemerkenswert war hierbei, dass *F. falciforme*-Isolat 2015-96 in diesem Versuchsaufbau gegenüber dieser KL-Kombilösung unempfindlich gewesen ist. In den beiden anderen verwendeten KL-Kombilösungen zeigte sich kein unterschiedliches Verhalten der Isolate.

Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere *F. petroliphilum* Isolat 2014-79 in einer der drei getesteten Kombilösungen häufiger auskeimt als *F. falciforme*, gleichzeitig aber effektiv die Myzelbildung gehemmt wird. Alle weiteren untersuchten Isolate beider Spp. verhalten sich ähnlich.

Bei keiner der beiden Arten konnte nach Inkubation in KL-Kombilösung eine Biofilm-Bildung auf den KL festgestellt werden, was auf die kurze Inkubationszeit oder die Unfähigkeit der Biofilmbildung der getesteten *Fusarium* spp. zurückzuführen sein könnte.

Auch in den Zytotoxizitäts- und IL-8 Versuchen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Spp. gezeigt werden. Hier könnten womöglich realitätsnähere Bedingungen im Versuchsaufbau, wie z. B. realistischeres Nachahmen der Einflüsse von KL auf Hornhautepithelzellen, Unterschiede aufdecken. Auch das verwendete mikroaerophile Milieu scheint die IL-8 Ausschüttung der Korneaepithelzellen zu beeinflussen.

Für die häufigere Assoziation von *F. petroliphilum* mit Hornhautinfektionen bei KL-Träger/innen in gemäßigten Breiten könnte demnach das natürliche Erregerreservoir die entscheidende Rolle spielen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass *F. falciforme* überwiegend in tropischen Gebieten verbreitet ist und eher im Boden und nicht wie *F. petroliphilum* in Innenräumen vorkommt.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Arbeit war, dass sich eine der getesteten KL-Kombilösungen als ineffektiv gegenüber beiden *Fusarium* spp. erwies. Hierdurch wäre *Fusarium* in der Lage, durch Kontamination der KL im Reinigungsgefäß in großer Zahl ins Auge des Trägers/der Trägerin zu gelangen und eine Infektion auszulösen. Ein Screening weiterer KL-Reinigungslösungen und die Dokumentation der von infizierten Patienten verwendeten Reinigungslösungen könnte daher zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von kontaktlinsenassoziierte Augeninfektionen und bestimmten KL-Kombilösungen besteht.

2 Summary

Fusarium (*F.*) - infections of the eye often show a severe course and are most frequently associated with species (spp.) of the *Fusarium solani species complex* (van Diepeningen et al., 2014, Walther et al., 2017, Walther et al., 2018). Wearing soft contact lenses (CL) and trauma are the most important predisposing factors (Gaujoux et al., 2008, Thomas and Kaliyamurthy, 2013, Ong et al., 2016, Bourcier et al., 2017). In previous studies of the National Reference Center for Invasive Fungal Infections it could be shown that infections caused by *F. petroliphilum* are associated with the use of CL, infections caused by *F. falciforme*, however, are predominantly trauma-associated and are mainly known from tropical and subtropical countries (Walther et al., 2018). This opposite behaviour of the spp. could be caused by differences in habitat and geographical distribution or by physiological differences such as germination rate, growth rate, tolerance to disinfectants, biofilm formation or cytotoxicity (Walther et al., 2018).

Therefore, the aim of this study was to investigate whether *F. falciforme* and *F. petroliphilum* have physiological characteristics that could be responsible for the differences in the risk factors for keratitis between the two spp.

For this purpose, the germination rate of the conidia and the length of the germ tubes of both *Fusarium* spp. was shown after staining of the conidia with fluorescein isothiocyanate and incubation at different incubation times in CL cleaning solutions at room temperature. A standardized approval test for CL cleaning solutions was carried out to investigate the behaviour of the conidia towards three different CL cleaning solutions that were available in Germany at the time of the investigations. Furthermore, the tolerance of the fungi to various CL cleaning solutions was examined in realistic conditions by incubating the conidia in CL cleaning solutions with CL overnight.

The ability of biofilm formation was assessed by applying the conidia to CL from various manufacturers in Sabouraud-dextrose-broth and various CL cleaning solutions.

The in vitro cytotoxicity of the conidia towards human corneal epithelial cells (HCE) was measured indirectly with the aid of a corneal epithelial cell model in aerobic and microaerophilic conditions via the lactate dehydrogenase release of HCE. Establishing a statement about the immune induction was possible due to the measurement of Interleukin-8 in the supernatants of the infection models.

After the nightly incubation of the conidia in CL cleaning solutions, a lower germination rate was found for all *F. petroliphilum* isolates than for the *F. falciforme* isolates in one of the three cleaning solutions. It was remarkable that *F. falciforme* isolate 2015-96 was insensitive to this

Summary

CL cleaning solution in this test setup. By contrast, the isolates did not show a different behaviour in the two other used CL cleaning solutions.

It could be also shown that *F. petroliphilum* isolate 2014-79 germinates more frequently in one of the three tested cleaning solutions than *F. falciforme*, but at the same time the mycelium formation is effectively inhibited. All other isolates of both spp. behave similarly.

After incubation the CL in CL cleaning solutions, no biofilm formation on the CL could be found in any of the two species in any of the test constellations, which could be due to the short incubation time or the inability of biofilm formation of the tested *Fusarium* spp.

In the cytotoxicity and IL-8 experiments, no difference between the two spp. could be found. More realistic conditions in the test setup, such as e. g. a more realistic imitating of the effects of CL on corneal epithelial cells, could possibly reveal any differences.

The natural pathogen reservoir could play the crucial role, why *F. petroliphilum* is more frequently associated of with corneal infections in CL users in moderate latitudes. A possible explanation could be that *F. falciforme* predominantly occurs in tropical areas and more often in the soil, whereas *F. petroliphilum* is more common in indoor areas.

Another important result of my studies was that one of the tested CL cleaning solutions was proven to be ineffective against both *Fusarium* spp. Consequently, *Fusarium* would be able to get into the eyes of the CL wearer in large numbers through contamination of the CL in the cleaning vessel and trigger an infection. A further screening of CL cleaning solutions and the documentation of the cleaning solutions used by infected patients could show whether there is a connection between the occurrence of contact lens-associated eye infections and certain CL cleaning solutions.

3 Einleitung

3.1 *Fusarium* spp.

Vertreter der Gattung *Fusarium* sind primär Pflanzenpathogene, wobei einige Arten eine ausgeprägte Spezialisierung auf bestimmte Pflanzengattungen zeigen, während andere Arten nur selten und schwach phytopathogen sind. Spezialisten mit enger Wirtsbindung wie *F. graminearum* und *F. verticillioides* führen jährlich zu enormen Schäden an Mais und Getreide (Windels, 2000, Munkvold, 2003). Schwach phytopathogene Arten leben überwiegend saprotroph auf abgestorbenen Pflanzenteilen, im Boden und in anthropogenen Habitaten wie Abwassersystemen. Die luftgetragenen Sporen der *Fusarium* spp. sind im Boden, Luft und Wasser nachweisbar (Zhang et al., 2006a, Mehl and Epstein, 2008).

Die Taxonomie der Gattung *Fusarium* ist derzeit, bedingt durch den Einsatz von DNA-Sequenzen zur Erstellung der Stammbäume (Phylogenien), stark im Wandel. Momentan werden in der Gattung etwa 300 Arten unterschieden (Al-Hatmi et al., 2018), die in 20 Artenkomplexe aufgeteilt sind (O'Donnell et al., 2013).

Einige Artenkomplexe können neben Pflanzen auch den Menschen infizieren und unterschiedliche Organsysteme befallen. Die drei klinisch bedeutendsten Artenkomplexe sind, geordnet nach ihrer Relevanz, der *Fusarium solani* species complex (FSSC), der *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) und der *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC). Vertreter dieser Artenkomplexe können verschiedene Krankheitsbilder (Fusariosen) verursachen. Dies sind u. a. Nagelinfektionen (Onychomykosen), Hautinfektionen, disseminierter Organbefall und Infektionen der menschlichen Hornhaut des Auges (Keratitis) bzw. Infektionen des gesamten Auges (Endophthalmitiden). Für gewöhnlich treten systemische Verläufe dieser Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten im Rahmen von hämatopoetischen Erkrankungen oder Humanes-Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektionen auf. Onychomykosen, Hautinfektionen und Infektionen des Auges kommen eher bei gesunden Menschen vor (van Diepeningen et al., 2014). Im Fall von Augeninfektionen sind Vertreter des FSSC die häufigsten Auslöser. Von 70 *Fusarium*-Isolaten von Keratitis-Patienten in Indien gehörten 53 Isolate dem FSSC an (Homa et al., 2013). Dabei sind Augeninfektionen bei in der Landwirtschaft tätigen Menschen in tropischen und subtropischen Gebieten nach Augentraumata mit Pflanzenbeteiligung und bei Menschen nach vorangegangener antibakterieller Therapie am Auge besonders häufig (Ahearn et al., 2008). Als weiterer wichtiger Risikofaktor ist insbesondere das Tragen weicher KL zu nennen (Gaujoux et al., 2008, Thomas et al., 2013, Ong et al., 2016, Bourcier et al., 2017, Behrens-Baumann et al., 2018).

3.2 Morphologie von *Fusarium* spp.

Die Pilze der Gattung *Fusarium* werden den Schlauchpilzen (Ascomycota) zugeordnet. Die fadenförmigen Pilzzellen (Hyphen), die in ihrer Gesamtheit als Myzel bezeichnet werden, bilden an apikal verjüngten Zellen, den sogenannten Phialiden asexuelle Sporen (Konidien) (Abb. 1). Typisch für die Gattung *Fusarium* ist die Bildung von zwei Konidientypen: kleine, ein- bis zweizellige Mikrokonidien und große, mehrzellige und oft gekrümmte Makrokonidien. Hyphen, die die Phialiden tragen, werden als Konidienträger (Konidiophore) bezeichnet. Die kleineren Mikrokonidien entstehen an Myzel-assoziierten Konidiophoren (Myzel-Konidiophoren), während die Makrokonidien an polsterartigen Sporodochien (Sporodochial-Konidiophoren) gebildet werden (Nelson et al., 1994). Neben den der Verbreitung dienenden Konidien werden auch noch Chlamydosporen gebildet, die der Überdauerung dienen.

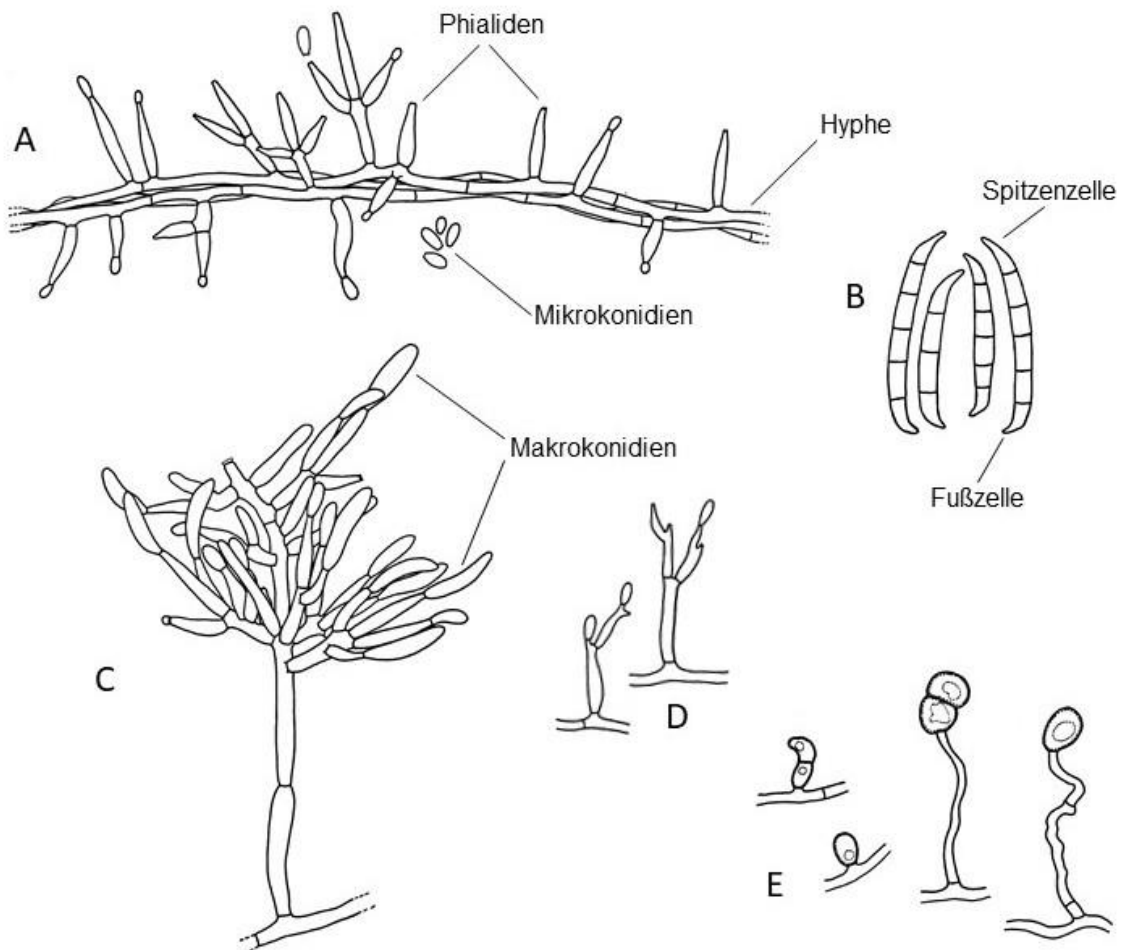


Abb. 1 Morphologie von *Fusarium*

A.: Mikrokonidien an Myzelial-Konidiophore, B.: Makrokonidien, C.: Makrokonidien an Sporodochial-Konidiophor, D.: Mikrokonidien an Polyphialiden, E.: Chlamydosporen,
 Mit freundlicher Genehmigung: Abbildungen mit ergänzender Beschriftung aus Walther & Kurzai (2015).

3.3 Kontaktlinsenassoziierte Infektionen des Auges durch *Fusarium* spp.

Keratitiden durch Pilze sind relativ selten (Chang et al., 2006). Neben Traumata am Auge ist das Tragen weicher KL ein wichtiger Risikofaktor (Gaujoux et al., 2008, Thomas et al., 2013, Ong et al., 2016, Bourcier et al., 2017, Behrens-Baumann et al., 2018). Zu den speziellen Risikofaktoren einer kontaktlinsenassoziierten Infektion des Auges gehören das Nichtbefolgen von Herstellerangaben der verwendeten KL und KL-Reinigungslösungen und übermäßiges Tragen von weichen KL, z. B. über Nacht (Chang et al., 2006).

Von Anfang Juni 2005 bis Ende Juni 2006 kam es zu einem *Fusarium*-Keratitis Ausbruch durch kontaktlinsenassoziierte humanpathogene *Fusarium* spp. bei nicht in der Landwirtschaft tätigen Menschen. Allein in den USA wurden innerhalb dieses Zeitraumes 164 Fälle mit Augeninfektionen durch *Fusarium* spp. bestätigt. 94% der Erkrankten verwendeten weiche KL. Zu deren Reinigung wurden in 57% der Fälle Bausch & Lomb ReNu® with MoistureLoc® (ReNu® ML) mit den Wirkstoffen Alexidine und Polyquaternium-10 verwendet. Unter den identifizierten Arten waren auch Vertreter aus dem FOOSC, jedoch konnten die meisten Arten dem FSSC zugeordnet werden (Chang et al., 2006). Da die ungeöffneten Produktchargen ohne *Fusarium*-Nachweis blieben, wurde als Grund für das Versagen der KL-Kombilösung die Abnahme der desinfizierenden Wirkung durch hohe Lagertemperaturen bei etwa 60 °C für mehrere Wochen vermutet (Bullock et al., 2008). Ein nicht näher bezeichneter, sich bei hohen Temperaturen aus dem Material der Aufbewahrungsbehälter von ReNu® ML herauslösender, wirkstoffneutralisierender Bestandteil wurde als Grund diskutiert (Bullock et al., 2016). Außerdem kann eine nicht sachgemäße Verwendung der KL-Kombilösung nach Herstellerangaben ein Versagen der Kombilösung hervorrufen. Zhang et al. (2006b) fanden heraus, dass ein Wiederverwenden des Aufbewahrungsbehälters für KL und ein erneutes Auffüllen mit frischer KL-Kombilösung einen Rückstandsfilm von ReNu® ML bildet. Dort konnte sich *Fusarium* spp. ausbreiten. Daneben können auch die KL selbst einen Einfluss auf die Effektivität der Kombilösung z. B. durch Aufnahme der antimikrobiell wirksamen Substanzen in das Linsenmaterial nehmen (Zhang et al., 2006b). Eventuell spielt auch die Fähigkeit von *Fusarium* spp. zur Biofilmbildung auf KL und deren Aufbewahrungsbehälter eine Rolle (Imamura et al., 2008, Mukherjee et al., 2012, Sav et al., 2018). Belegt ist außerdem, dass es andere KL-Kombilösungen mit verminderter Wirksamkeit gegenüber Vertretern der Gattung *Fusarium* gibt (Hume et al., 2009, Iguban et al., 2013, Siddiqui et al., 2015). Dabei ist anzunehmen, dass *Fusarium*-Laborstämme wie der ISO Standard-Laborstamm *Fusarium keratoplasticum* ATCC 36031, der für Zulassungstestungen von KL-Kombilösungen verwendet wird, empfindlicher gegenüber KL-Kombilösungen ist als klinische Isolate (Hume et al., 2009). Nach dem Rückzug der KL-Kombilösung ReNu® ML vom amerikanischen Markt, sank die Inzidenz von *Fusarium*-assoziierten Keratitiden wieder auf ein normales Niveau ab (Gower et al., 2010).

3.4 *Fusarium* spp. assoziierte Augeninfektionen in Deutschland

Unter allen durch Pilze ausgelösten Keratitiden stellen in Deutschland *Fusarium* spp., noch vor *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. die häufigsten Auslöser dar. Zur Diagnostik werden die Kultur, die Histologie, die konfokale Mikroskopie und/oder die PCR verwendet. Bis zum Stellen der richtigen Diagnose vergehen im Mittel 31,7 Tage (Roth et al., 2019). Zur genauen Identifizierung der Spp. kommen die Sequenzierung bestimmter Markergene wie der Translationselongationsfaktor 1 α (He et al., 2011) oder die Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie zum Einsatz (van Diepeningen et al., 2014).

In den Jahren 2014 und 2015 wurden dem NRZMyk 22 *Fusarium*-Isolate von Patienten mit Infektionen am Auge aus Deutschland zugesandt. Einziger gemeinsamer Risikofaktor dieser 22 Fälle der sonst gesunden Patienten war das Tragen von weichen KL. Unter den Keratitis erregenden Arten waren Vertreter des FSSC, des FOOSC und des FFSC, wobei auch hier die Vertreter des FSSC mit 13 Fällen dominierten. Arten des FOOSC wurden in sechs Fällen identifiziert, wobei diese nicht direkt vom Auge, sondern in allen sechs Fällen von KL oder KL-Kombilösungen isoliert wurden. Die Behandlung der Keratitiden ist aufgrund der Resistenzen der *Fusarium* spp. gegenüber verschiedenen Antimykotika schwierig. Bei Empfindlichkeitstests der klinischen Isolate gegenüber Antimykotika zeigten FSSC-Isolate durchweg minimale Hemmkonzentrationen (MHK) für Azolderivate wie z. B. Posaconazol (MHK 16 mg/L), Isavuconazol (MHK 16 mg/L) und Itraconazol (MHK 16 mg/L), für Terbinafin (MHK 64 mg/L) und Caspofungin (MHK 16 mg/L). Für Amphotericin B (MHK 0,5 – 4 mg/L), Natamycin (MHK 4 – 16 mg/L) und z. T. für Voriconazol (MHK 1 – 16 mg/L) waren die MHK-Werte geringer. Isolate des FOOSC und des FFSC wiesen für Voriconazol teilweise, und für Terbinafin deutlich geringere MHK-Werte auf (Walther et al., 2017).

In der beschriebenen Studie kam bei 6 Patienten als definitive Therapie eine Transplantation der Kornea (Keratoplastie) bzw. bei 3 Patienten eine Entfernung des gesamten Auges (Enukleation) zur Anwendung. Von den 22 nachgewiesenen *Fusarium* spp. als Auslöser der Keratitiden dominierte mit 6 Fällen *F. petroliophilum* (Walther et al., 2017).

Durch die Fallzahlen des NRZMyk in den darauffolgenden Jahren wurde die Dominanz von *F. petroliophilum* als Erreger von KL-assoziierten Keratitiden noch deutlicher. Im Zeitraum Januar 2014 bis Juli 2018 gab es 13 gesicherte durch *F. petroliophilum* verursachte Keratitisfälle, die KL-assoziiert waren und nur 2 durch *F. falciforme* ohne KL-Assoziation ausgelöste Keratitisfälle. Beide Spp. werden dem FSSC zugeordnet. Auch bei dem bereits erwähnten Ausbruch von KL-assoziiierter Keratitis im Jahr 2005/06 war *F. petroliophilum*, damals noch als FSSC 1 bezeichnet, die vorherrschende Art (O'Donnell et al., 2007).

3.5 *Fusarium* spp. assoziierte Augeninfektionen in Indien

In Indien ist das Tragen von KLS wenig verbreitet, und der wesentliche Risikofaktor für eine Pilzkeratitis sind durch Pflanzen verursachte Traumata. Durch die weitere Auswertung der Sequenzdaten einer indischen Studie (Homa et al., 2013) wurde deutlich, dass diese nicht KL-assoziierten Keratitiden überwiegend durch *F. falciforme* ausgelöst werden, während *F. petroliphilum* bei diesem Patientenkollektiv nur eine untergeordnete Rolle spielt (Walther et al., 2018). Zu diesem Zeitpunkt wurde vermutet, dass *F. falciforme* vor allem im Boden verbreitet ist (Zhang et al., 2006a), *F. petroliphilum* wurde dagegen vor allem von anthropogenen Quellen wie Abflüssen und Rohrleitungen isoliert (Short et al., 2013). Neben der unterschiedlichen Verbreitung könnten jedoch auch physiologische Unterschiede zwischen den beiden Arten für die verschiedenen Krankheitsbilder verantwortlich sein.

3.6 Resistenzmechanismen von *Fusarium* spp. gegen Antimykotika

Bei den Resistenzen gegenüber Echinocandinen und der Mehrheit der Azole handelt es sich um ein intrinsisches Phänomen, das bei allen *Fusarium*-Arten vorhanden ist. Für die Azol-Resistenz scheint eine Veränderung der Cytochrome P450-Familie 51, Unterfamilie A (CYP51A) verantwortlich zu sein (Al-Hatmi et al., 2016). CYP51 codiert das Enzym Sterol 14 α -Demethylase, welches für die Sterol-Biosynthese nötig und Angriffspunkt für Azol-Antimykotika ist (Fan et al., 2013). Als Ursache für die Resistenz gegenüber Echinocandinen wird eine Mutation am FKS1-Gen vermutet. Dabei wird angenommen, dass dieses Gen für eine Untereinheit der β -1,3-Glucan-Synthase codiert und damit für die Bildung der Pilzzellwand nötig ist (Katiyar and Edlind, 2009).

3.7 Durch *Fusarium* spp. ausgelöste Immunreaktion am Auge

Da *Fusarium* spp., einschließlich der Vertreter des FSSC, in direkter Umgebung des Menschen wie z. B. in der Luft, in Gartenerde, auf abgestorbenen Pflanzenteilen, aber auch in Abflüssen und Wasserrohren vorkommen, können die Pilze direkt oder indirekt in Kontakt mit dem Menschen kommen (Mehl et al., 2008).

Das Augenlid, der Tränenfilm und der Aufbau der Kornea schützen das Auge vor Keimen. Durch die mechanische Reinigung des Lids wird ein Anhaften von Pathogenen vermindert. Zusätzlich enthält der Tränenfilm verschiedene, antimikrobiell wirksame Substanzen wie β -Defensin und Lysozym. Bedeckt wird die Kornea durch ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel, darauf folgt das Stroma, welches von der vorderen Augenkammer durch ein Endothel abgegrenzt ist (Leal and Pearlman, 2012b).

Als äußerste Struktur des Auges ist das Epithel der Kornea der Umwelt und möglichen Pathogenen ausgesetzt, die Infektionen des Auges verursachen können. Die obersten Epithelschichten der Kornea bilden Mannose-Glykoproteine, an denen die Mannoproteine der *Fusarium*-Zellwand anhaften. Direkte Traumata und auch das Tragen von KL führen zusätzlich zu einer Hochregulierung der Mannose-Glykoproteine an den Epithelzellen (Lakhundi et al., 2017).

Daneben stehen die von vielen *Fusarium*-Arten gebildeten Mykotoxine wie Fusarinsäure, Moniliformin oder Fumonisin B1 im Verdacht, zur Pathogenität gegenüber humanen Korneastrukturen beizutragen (Naiker and Odhav, 2004, Anutarapongpan et al., 2018). Beispielsweise stören Fumonisine die Synthese von Sphingolipiden, die einen wichtigen Bestandteil der Zellmembran ausmachen (Anutarapongpan et al., 2018). Auch Fusarinsäure scheint durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einen zellmembranschädigenden Einfluss auf humane Zellen zu haben, was zum geordneten Zelltod (Apoptose) führen kann (Devnarain et al., 2017).

Entscheidend für die Entstehung einer Immunreaktion ist die Erkennung des Pilzes durch die Korneaepithelzellen (Abb. 2). Pathogen-spezifische Oberflächenstrukturen (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) werden durch spezifische Pathogenrezeptoren auf den Korneaepithelzellen (*Pattern recognition receptor*, PRRs) erkannt (Cong et al., 2015). Die Toll-like Rezeptoren-2 und -4 (TLR-2/-4) an der Zellwand der Korneaepithelzellen sind Beispiele für PRRs, die durch die Adhäsion von *Fusarium* spezifischen PAMPs in ihrer Anzahl hochreguliert werden (Jin et al., 2007). Diese Aktivierung führt in Korneaepithelzellen zur Phosphorylierung von *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha* (I κ B α), einer Untereinheit von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B). Durch Verlust der p50 und p65 Untereinheit kann NF- κ B an seine Zielgene im Zellkern binden. Dadurch werden proinflammatorische Botenstoffe (Zytokine) wie IL-6 und IL-8 produziert und freigesetzt (Hou et al., 2017).

IL-8 ist besonders bedeutend bei der Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Am Ort der Infektion angekommen, treten diese dann vom Blut ins extravasale Gewebe über und stellen dort einen entscheidenden Faktor bei der Bekämpfung von pathogenen Pilzen dar (Segal, 2005).

Neben den neutrophilen Granulozyten kommt den im Korneastroma vorhandenen Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von *Fusarium* spp. zu (Abb.2). Makrophagen besitzen Dectin-1 als β -Glucan-Rezeptor (Taylor et al., 2002) und können so auskeimende Konidien oder Hyphen über das in der Zellwand enthaltene β -Glucan erkennen (Leal et al., 2010). Dies führt neben rezeptorvermittelter Phagozytose von *Fusarium*-Bestandteilen zu einer NF- κ B vermittelten Ausschüttung von IL-1 β . IL-1 β kann so dendritische Zellen und

Keratozyten im Stroma der Kornea und weitere Korneaepithelzellen aktivieren. Entscheidend ist auch hier die daraus resultierende Ausschüttung von IL-8 zur Rekrutierung weiterer neutrophiler Granulozyten zum Ort der Infektion (Leal et al., 2012b).

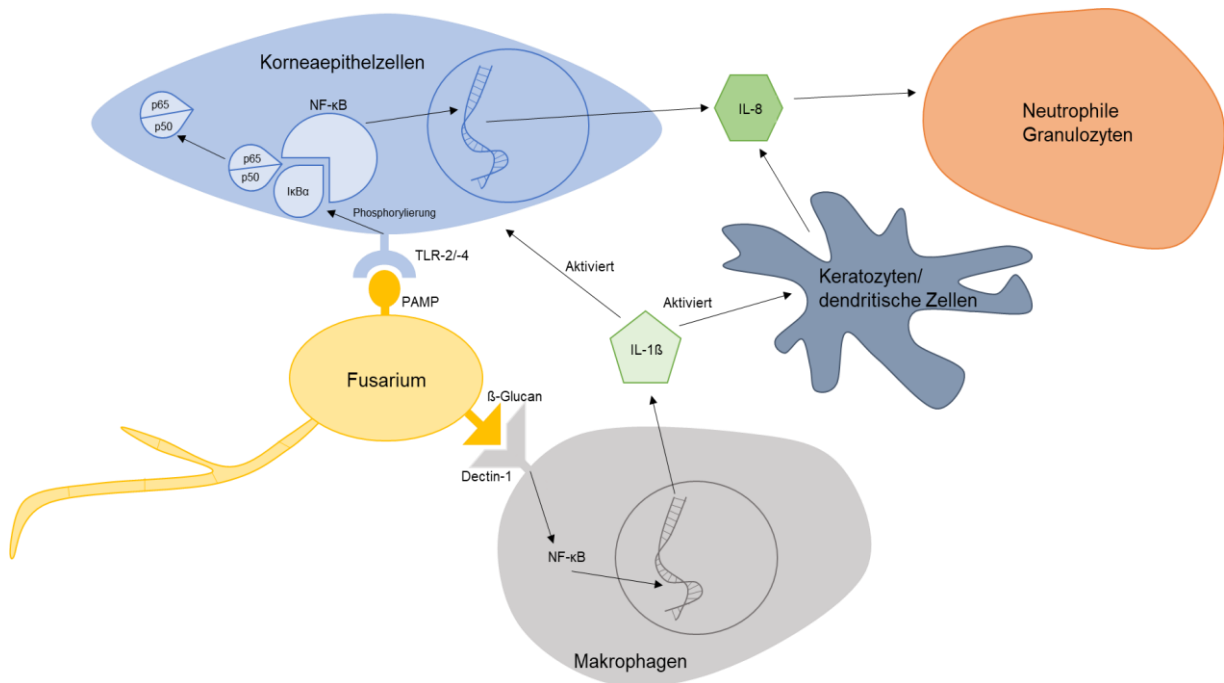


Abb. 2 Unspezifische Immunreaktion ausgelöst durch *Fusarium* spp. am Auge

Korneaepithelzellen und Makrophagen erkennen Teile von *Fusarium* spp. und sind über die Ausschüttung von IL maßgeblich an der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt.

Den zweiten Pfeiler der Immunantwort stellt die erworbene bzw. spezifische Immunantwort dar. Durch Kontakt mit spezifischen Antigenen werden naive, also unspezifische T-Helferzellen (Th-Zellen) aktiviert und selektioniert und können dann z. B. als immunkompetente Th17 Zellen IL-17 ausschütten. Diese Differenzierung zu Th17-Zellen wird maßgeblich durch die Zytokine Transforming growth factor-β und IL-6 ausgelöst (Bettelli et al., 2006). IL-17 ist selbst in der Lage, die Bildung von Vascular endothelial growth factor-D durch lymphatische Endothelzellen zu initiieren, was zu einer Infiltration der Kornea mit Blut- und Lymphgefäßen führt. Beides erleichtert die vermehrte Rekrutierung von Immunzellen, besonders von neutrophilen Granulozyten an den Ort der Inflammation (Segal, 2005, Taylor et al., 2014).

3.8 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei *Fusarium*-Infektionen des Auges

Im Rahmen der Immunreaktion bei einer Keratitis durch *Fusarium* spp. spielen die maßgeblich durch IL-8 rekrutierten neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Abwehr der Pilze. Für diesen Zweck besitzen sie drei wesentliche Effektormechanismen:

1. ROS
2. Phagozytose von Pilzbestandteilen
3. Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs)

Durch das an der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten vorhandene Enzym NADPH-Oxidase sind sie in der Lage, ROS zu erzeugen. Dies geschieht im Fall von Hyphen durch Aktivierung der neutrophilen Granulozyten über den PRR *complement receptor 3*, im Fall von Konidien über die β -Glucan Erkennung durch Dectin-1. Die ROS-Derivate, wie das nur kurzzeitig stabile O_2^- , welches auch zu stabilerem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt werden kann, werden freigesetzt und gelangen über Porine und Ionenkanäle in die Pilzzellen. Dort können sie Zellbestandteile der Pilzzelle durch Oxidation schädigen (Leal et al., 2012a).

Der zweite Effektormechanismus neutrophiler Granulozyten ist die rezeptorvermittelte Aufnahme von *Fusarium*-Bestandteilen in ihr Zellinneres (Phagozytose) mit anschließendem Einschluss in Phagosomen. Diese bilden zusammen mit Lysosomen Phagolysosomen, in denen die aufgenommenen *Fusarium*-Bestandteile durch Enzyme proteolytisch abgebaut werden. Diese Enzyme entstammen verschiedenen Arten von Granula. Die azurophilen (primären) Granula enthalten u. a. Myeloperoxidase (MPO) und Elastase, die spezifischen (sekundären) Granula enthalten Collagenase und Lysozym und die tertiären Granula enthalten Gelatinase (Hickey and Kubes, 2009). Die Phagozytose ist, wie die Ausschüttung von Zytokinen und ROS, abhängig von einer Erkennung des Pathogens über PRRs. Auch hier spielt der Dectin-1 Signalweg eine entscheidende Rolle (Goodridge et al., 2011).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass neutrophile Granulozyten NETs bilden können. NETs sind extrazellulär gebildete netzartige Strukturen, die aus DNA und u. a. aus Histonen, Elastase, MPO und weiteren Granula-assoziierten Proteinen aufgebaut sind. Durch die Freisetzung von NETs werden die neutrophilen Granulozyten zerstört. Durch diese Strukturen können sowohl Bakterien als auch Pilze gefangen und unschädlich gemacht werden. Gerade zur Bekämpfung von Hyphen ist dieser Mechanismus entscheidend (Urban et al., 2006). Jin et al. (2016) konnten ein Auftreten von NETs bei durch *Fusarium* spp. hervorgerufenen Keratitiden beweisen, und stellten einen Zusammenhang zwischen der gemessenen Anzahl an NETs und dem Ansprechen auf Therapie bzw. der Krankheitsdauer her. Je mehr NETs vorhanden waren, desto besser war das therapeutische Ansprechen und umso kürzer die Krankheitsdauer.

3.9 Korneamodelle für den experimentellen Einsatz

Zur Untersuchung von Einflüssen durch *Fusarium* spp. auf Korneaepithelzellen wird häufig auf Kornea von Labormäusen oder -ratten zurückgegriffen (Wu et al., 2004, Sun et al., 2010, Abou Shousha et al., 2013, Taylor et al., 2014). Der Einsatz von Tieren in Laborversuchen und die oft zahlreichen benötigten Untersuchungstiere setzen hohe ethische Standards voraus und machen die Suche nach Alternativen nötig (Badyal and Desai, 2014).

Einschichtige Korneaepithelzellmodelle stellen eine Möglichkeit zur Infektionsforschung mit *Fusarium* spp. dar (Jin et al., 2007). Allerdings sind diese Modelle aufgrund ihres Aufbaus nicht auf alle Fragestellungen anwendbar. So fehlt z. B. die Interaktion zwischen verschiedenen Keratozyten und Epithelzellen (Pinnock et al., 2017). Einschichtige Korneaepithelzellmodelle können aus primären oder immortalisierten Korneaepithelzellen aufgebaut sein. Der Vorteil immortalisierter Modelle ist die längere Überlebenszeit in Kultur von 20 Passagen und mehr (Kahn et al., 1993) gegenüber Primärzellen von Spendern, die oft nur weniger als 3 Passagen kultivierbar sind (Araki-Sasaki et al., 1995).

Zusätzlich finden auch Korneamodelle bestehend aus vollständigen humanen Spenderkorneas in Infektionsmodellen mit *Fusarium* spp. Anwendung (Hua et al., 2010). Deren Einsatz bietet eine gute Abbildung der Wirklichkeit, ist jedoch in der Verfügbarkeit mengenmäßig stark limitiert.

Eine andere Variante sind dreidimensionale Hemikorneamodelle aus Epithel und einem Stroma aus Kollagen und Keratozyten (Hahne and Reichl, 2011, Couture et al., 2016). Ebenso sind Korneamodelle, die den gesamten Aufbau einer Kornea mit allen Schichten aus mehrschichtigem Epithel, Stroma und Endothel nachbilden eine weitere mögliche Variante (Reichl et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nichttierische Infektionsmodelle bei der Untersuchung der Interaktion zwischen *Fusarium* spp. und Korneaepithelzellen nicht sehr verbreitet sind. Da die Etablierung eines Infektionsmodells zeit- und kostenintensiv ist, wurde für diese Arbeit ein vergleichsweise einfaches und für die Fragestellungen passendes Infektionsmodell aus einschichtigen, immortalisierten Korneaepithelzellen des Typs HCE-2 [50.B1] (ATCC® CRL-11135™) gewählt und in der Arbeitsgruppe etabliert.

4 Zielsetzung

Infektionen des Auges durch *Fusarium* spp. zeigen häufig schwere Verläufe. Die wichtigsten Erreger-Arten sind *F. petroliphilum* und *F. falciforme*, wobei *F. petroliphilum* vor allem KL-assoziierte Infektionen auslöst, während *F. falciforme* bei Trauma assoziierten Infektionen dominiert. Um zu klären, ob die Verbindung mit unterschiedlichen Risikofaktoren die Folge physiologischer Unterschiede zwischen diesen beiden Arten ist, verfolge ich mit meiner Arbeit die hier aufgeführten Ziele:

1. Etablierung eines Infektionsmodells zur Untersuchung der Zytotoxizität von *Fusarium* spp. gegenüber humanen Korneaepithelzellen
2. Beurteilung der Wirksamkeit gängiger KL-Kombilösungen gegenüber *F. falciforme* und *F. petroliphilum*
3. Beurteilung von Unterschieden zwischen *F. falciforme* und *F. petroliphilum* hinsichtlich Wachstumsverhalten, der Empfindlichkeit gegenüber gängigen KL-Kombilösungen, der Biofilmbildung auf verschiedenen KL, sowie der In-vitro-Zytotoxizität und der IL-8-Freisetzung durch humane Korneaepithelzellen nach Infektion mit *Fusarium* spp.

5 Material

5.1 Verwendete Pilzstämme

In dieser Studie wurden klinische *Fusarium*-Isolate verwendet, die dem NRZMyk zwischen 2014 und 2016 zur Untersuchung übersandt worden sind. Als Kontrollstamm diente *Candida albicans* SC5314 (Gillum et al., 1984).

Tab. 1 Verwendete *Fusarium*- und *Candida*-Spp.

Spezies	Spezies-komplex	JMRC Stamm-Nr.	Stamm-Nr.	Quelle
<i>Fusarium falciforme</i>	FSSC	JMRC: NRZ:0138	2015-096	Korneaabstrich bei Keratitis
<i>Fusarium falciforme</i>	FSSC	JMRC: NRZ:0369	2016-123	Kornealulkus
<i>Fusarium petroliphilum</i>	FSSC	JMRC: NRZ:0017	2014-013	Vordere Augenkammer bei Endophthalmitis
<i>Fusarium petroliphilum</i>	FSSC	JMRC: NRZ:0012	2014-022	Korneaabstrich bei Keratitis und Endophthalmitis
<i>Fusarium petroliphilum</i>	FSSC	JMRC: NRZ:0059	2014-079	Korneaabstrich bei Endophthalmitis
<i>Fusarium petroliphilum</i>	FSSC	JMRC: NRZ:0086	2015-035	Korneaabstrich bei Endophthalmitis
<i>Candida albicans</i>			SC 5314	Laborbestand der Arbeitsgruppe Kurzai

5.2 Kulturmedien zur Anzucht der Pilzstämmen

Tab. 2 Kulturmedien für *Fusarium* spp. und *C. albicans* SC5314

Medium	Rezept für 1L	Hersteller
YPD-Agar pH 5	1000 ml Wasser 20g Pepton 10g BD Bacto™ Hefeextrakt ROTIPURAN® ≥25% Salzsäure (HCL) zur pH Einstellung	Universitätsklinikum Würzburg Merck KGaA BD Biosciences Carl Roth GmbH + Co. KG
Haferflocken-Agar	1000 ml Wasser 30g Haferflocken 15g BD Difco™ Agar	Universitätsklinikum Würzburg Peter Kölln GmbH & Co. KGaA BD Biosciences
Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA) pH 5,6 ± 0,2	1000 ml Wasser 39g Oxoid™ PDA	Universitätsklinikum Würzburg Thermo Fisher Scientific
Sabouraud-Dextrose-Agar (Sab-Agar) pH 5,6 ± 0,2	1000 ml Wasser 65g Sabouraud-4% Glucose-Agar 0,0123g Penicillin 0,048g Streptomycin	Universitätsklinikum Würzburg Merck KGaA Carl Roth GmbH + Co. KG Merck KGaA
Sab-Agar, gebrauchsfertig	BD Sabouraud Agar mit Penicillin und Streptomycin	Becton Dickinson GmbH
Sabouraud-Dextrose-Bouillon (Sab-Bouillon) pH 5,6	1000 ml Wasser 40g D(+)- Glucose-Monohydrat 10g BD Bacto™ Pepton ROTIPURAN® ≥25% HCL zur pH Einstellung	Universitätsklinikum Würzburg Merck KGaA BD Biosciences Carl Roth GmbH + Co. KG

5.3 Epithelzelllinien in den verwendeten Infektionsmodellen

Zur Etablierung des Infektionsmodells mit *Fusarium* spp. wurden zunächst humane Pharynxkarzinomzellen vom Typ FaDu (ATCC® HTB-43™) verwendet. Diese Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der aeroben Versuche in der 122. und während der mikroaerophilen Versuche in der 123. Passage.

In den weiteren Versuchen wurden humane Korneaepithelzellen vom Typ HCE-2 [50.B1] (ATCC® CRL-11135™) eingesetzt. Während der aeroben und mikroaerophilen Versuche waren die Zellen in der achten bzw. neunten Passage.

5.4 Zelllinien, Zellkulturmedien und Zusätze

Tab. 3 Verwendete Zellkulturmedien, Zusätze und Reagenzien für die Zellkultur

Anwendung	Medium	Hersteller
HCE-2 [50.B1] (ATCC® CRL-11135™)	Keratinocyten-Serum Free Media (SFM) Kit	Thermo Fisher Scientific
Wachstumsmedium	Hydrocortison Bovines Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
HCE-2 [50.B1] (ATCC® CRL-11135™)	Bovines Kollagen Typ I Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Coating	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 GlutaMAX™-I Humanes Fibronectin 1mg/ml	Thermo Fisher Scientific
FaDu (ATCC® HTB-43™)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX™-I	Thermo Fisher Scientific
Wachstumsmedium	Gibco™ Fetal Calf Serum (FCS)	
Zelltrypsinierung	0,05% Trypsin- Ethylen- diamintetraacetat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific
Zusätze zum Einfriermedium	Dimethylsulfoxid (DMSO) Gibco™ FCS	A. Hartenstein GmbH Thermo Fisher Scientific

5.5 Kontaktlinsenreinigungslösungen

Tab. 4 Verwendete KL-Kombilösungen und deren Wirkstoffe

KL-Kombilösung	Bezeichnung	Wirkstoff	Hersteller
Cool® Clear Kombilösung	Kombilösung A	0,10% w/v Oxipol® (enthält H ₂ O ₂)	CooperVision GmbH
Cool® CyClean® Kombilösung	Kombilösung B	0,0001% w/v Polyhexanid Biopol®	CooperVision GmbH
Optifree® Puremoist®	Kombilösung C	0,001% Polyquad® (Poliquaternium 1), 0,0006% Aldox® (Myristamidopropyl- dimethylamin)	ALCON Pharma GmbH

5.6 Kontaktlinsen

Tab. 5 Verwendete KL und deren Materialien

Kontaktlinse	Bezeichnung	Material	Hersteller
Cool® Day Tageslinse	Kontaktlinse A	55% Wasser 45% Methafilcon IV	CooperVision GmbH
Cool® Silikon Hydrogel	Kontaktlinse B	56% Wasser 44% Somofilcon A	CooperVision GmbH
1-Day Acuvue® Moist® with Lacreon™	Kontaktlinse C	58% Wasser Etafilcon A	Johnson & Johnson

5.7 Chemikalien

Tab. 6 **Verwendete Reagenzien**

Reagenzien / Reaktionskits	Hersteller
FITC (Emissionsmaximum bei 518 nm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific
Delbeccos' s Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific
Carbonat-Bicarbonat-Puffer Kapseln	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DMSO	A. Hartenstein GmbH
DPBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tween 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natrium Pyruvat 100mM	Thermo Fisher Scientific
Dey-Engley-Neutralization Broth	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH
1N Salzsäure (HCL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ProcartaPlex™ Human Basic Kit	Thermo Fisher Scientific
IL-8 Human ProcartaPlex™ Simplex Kit	Thermo Fisher Scientific
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG
Braun Aqua Ecotainer Spüllösung (Aqua dest.)	B. Braun Melsungen AG

5.8 Technische Geräte

Tab. 7 **Verwendete technische Geräte**

Gerät	Name	Hersteller
CO ₂ Inkubator 1	Memmert Inoc 246	Memmert GmbH + Co. KG
CO ₂ Inkubator 2	Heraeus Function Line BB16	Heraeus Instruments GmbH
Tischzentrifuge	Hettich Rotana 460R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
ELISA-Reader	Molecular Devices SpectraMax® iD3	Molecular Devices
Begasungsgerät	Jenny Medical Trilab	Jenny Science AG
Mischgas zur Erzeugung des mikroaerophilen Milieus im Infektionsmodell	Gasgemisch - 10% Kohlenstoffdioxid - 10% Wasserstoff - 80% Stickstoff	Air Products GmbH
Inverses Mikroskop	Zeiss Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzmikroskop	Keyence BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH
Multiplex Immunoassay Reader	Bio-Plex® 200	Bio-Rad Laboratories

5.9 Software

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme wurden mit Microsoft Office Excel 365 durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Programm BZ-II Image Viewer 1.4 von Keyence aufgenommen. Mit dem Programm BZ-II Analyzer 1.4, ebenfalls von Keyence, wurden Overlays erzeugt und bearbeitet. Die invertierten mikroskopischen Aufnahmen wurden mit AxioVision Release 4.6 von Zeiss aufgenommen und bearbeitet. Zusätzlich wurden Bilder mit der Bildbearbeitungssoftware Paint Shop Pro X von Corel nachbearbeitet.

6 Methoden

6.1 Bestimmung der Zell- und Konidienzahl

Sowohl die Zählung der humanen Zellen als auch die der Konidien wurden manuell mit einer Neubauer Improved Zählkammer durchgeführt.

Bei der Auszählung von humanen Zellen wurde zunächst eine Lebend-Tod-Färbung mit Trypanblau durchgeführt. Durch ihre deutliche Blaufärbung konnten tote Zellen von hellen, lebenden Zellen mikroskopisch unterschieden werden. Nur die lebenden Zellen wurden bei der Bestimmung der Konzentration berücksichtigt.

6.2 Pilzkultivierung

Für die meisten Versuche wurden die *Fusarium*-Stämme auf Sab-Agarplatten für 3 bis 4 Tage bei 34 °C bebrütet. Nur für den Versuch nach der DIN EN ISO 14729 wurden die Stämme 10 bis 15 Tage auf PDA-Platten bei 20 bis 25 °C kultiviert. Im Gegensatz zu den filamentösen *Fusarium*-Stämmen wurden für die Kultivierung des *C. albicans*-Stammes YPD-Agarplatten verwendet. Die Wachstumszeit lag ebenfalls bei 3 bis 4 Tagen bei 34 °C.

6.3 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit Zellkulturen fanden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 statt. Auf Antibiotikazusatz im Kulturmedium wurde verzichtet.

6.3.1 Kultivierung der humanen Pharynxkarzinomzellen FaDu (ATCC® HTB-43™)

Die Zellen wurden in 75 cm² großen Zellkulturflaschen in 15 ml DMEM und 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage erneuert.

Nach Erreichen von mikroskopisch beurteilter Konfluenz der Zellen wurden diese zusammen mit 0,05 % Trypsin-EDTA inkubiert. Nach 20 bis 30 Minuten (min) Inkubation waren die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden daraufhin bei 150 x g für 5 min zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und entweder in neue Kulturflaschen überführt oder in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen gezählt und mit Nährmedium und dem Zusatz von 5 % DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für eine erneute Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut.

6.3.2 Kultivierung der humanen Korneaepithelzellen HCE-2 [50.B1] (ATCC® CRL-11135™)

Die Kultivierung und Konservierung der Zellen entsprach mit folgenden Ausnahmen dem Vorgehen bei den FaDu (ATCC® HTB-43™) Zellen.

Als primäre Kulturgefäße wurden vorbeschichtete 25 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Eine 75 cm² Kulturflasche wurde mit 4,5 ml, eine 25 cm² Kulturflasche mit 2 ml Beschichtungsmedium (97 ml RPMI 1640 GlutaMAX®-I, 1 mg BSA, 1 mg in 1 ml PBS gelöstes humanes Fibronectin und 3 mg in 1 ml 0,01 M HCL gelöstes Kollagen Typ I) befüllt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Vor dem Einfüllen von Zellen musste das Medium abgenommen und die Flaschen 15 min zum Trocknen geöffnet werden.

Als Nährmedium kam Keratinozyten-SFM Basismedium, ergänzt mit EGF und BPE zur Anwendung. Zusätzlich wurden je 480,75 ml Basismedium, 0,25 ml Insulin und 4,8 ml Hydrocortison ergänzt. In den 75 cm² Flaschen wurden 15 ml und in den 25 cm² Flaschen wurden 5 ml Medium verwendet.

Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen zusammen mit 0,05% Trypsin-EDTA 5 min im Zellinkubator inkubiert. Das Medium zur Kryokonservierung bestand aus Wachstumsmedium und dem Zusatz von 10% FBS und 5% DMSO.

6.4 Untersuchung des Verhaltens von *F. falciforme* und *F. petroliphilum* in KL-Kombilösungen

6.4.1 Nächtliche Inkubation von *F. falciforme* und *F. petroliphilum* auf KL

Die Konidien von *F. falciforme* und *F. petroliphilum* wurden von 3 bis 4 Tage alten Kulturplatten mit Aqua dest. abgespült, die Konidiensuspensionen zentrifugiert und der Wasserüberstand abgenommen. Im Anschluss wurden für alle Stämme mit den verschiedenen KL-Kombilösungen Konidiensuspensionen mit einer Konidienkonzentration von 1x10⁶ Konidien/ml hergestellt.

Für jeden der sechs Stämme wurden drei verschiedene KL-Kombilösungen (A-C) mit jeweils drei KL-Typen (A-C) untersucht, so dass pro Stamm 9 KL eingesetzt wurden. Dazu wurden

die KL unter sterilen Bedingungen mit der konvexen Seite nach unten in je ein Well einer 12-Well-Platte gelegt und mit 4 ml Konidiensuspension bedeckt.

Um möglichst nah an der realistischen Verwendung sowohl der Kombilösungen als auch der KL zu bleiben, wurden die KL bei Dunkelheit und 25 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die KL mit der jeweiligen Kombilösung abgespült, unter sterilen Bedingungen in zwei bis drei Teile zerschnitten und mit der konkaven Seite nach unten auf Sab-Agarplatten gelegt. Nach zweitägiger Inkubation bei 25 °C folgte eine semiquantitative Auswertung durch Zählung der gewachsenen Kolonien nach folgendem Schema:

- ++++ > 200 KBE oder flächiges, dichtes Myzel
- +++ 100 – 200 KBE
- ++ 11 – 100 KBE
- + 1 – 10 KBE
- kein Wachstum sichtbar

Für die Auswertung wurde die Anzahl der „+“ aus drei unabhängigen Versuchen für jeden Stamm in jeder KL-Kombilösung und jeder KL addiert und ein Mittelwert gebildet.

6.4.2 Ermittlung der Keimrate und der durchschnittlichen Keimschlauchlänge von *F. falciforme* und *F. petroliphilum* durch FITC-Färbung

Durch die Färbung mit dem Fluorochrom FITC werden alle zum Färbezeitpunkt vorhandenen Zellabschnitte der Konidien gefärbt und fluoreszieren bei Anregung grün. Alle nach der Färbung gewachsenen Anteile bleiben jedoch ungefärbt, fluoreszieren nicht und sind im Overlay-Bild von den zum Färbezeitpunkt vorhandenen Strukturen abgrenzbar.

Die Konidien wurden mit Aqua dest. von den Sab-Agarplatten abgeschwemmt, zentrifugiert und in Sab-Bouillon resuspendiert. Anschließend wurde mit Sab-Bouillon eine Konidiensuspension mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^7$ Konidien/ml hergestellt. Zur Auskeimung wurden die Konidien zunächst für 2,5 h unter Schütteln bei 34 °C inkubiert. 10 mg FITC Pulver wurden unter lichtarmen Bedingungen in 2 ml DMSO gelöst und 1 : 100 mit 0,05 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer verdünnt. Auf die Inkubation folgte ein Waschschrift der Konidien (2000 x g, 3 min, resuspendiert mit 1x HBSS). Nach einer weiteren Zentrifugation wurde jedes Pellet mit 1 ml FITC/Carbonat-Bicarbonat-Puffer-Lösung resuspendiert und 15 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften wurden die Pellets in

der jeweiligen KL-Kombilösung resuspendiert. Je 1 ml der Suspension mit einer Gesamtzahl von $2,5 \times 10^5$ Konidien wurde in die Wells einer 12-Well Platte übertragen und bei RT und absoluter Dunkelheit gelagert.

Zu den Zeitpunkten 0 h = Färbungszeitpunkt, 17 h, 24 h und 47 h wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-9000) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung mit einer Emissionswellenlänge im Bereich von 510 bis 560 nm angefertigt. Zur Auswertung wurde ein Overlay aus fluoreszenzmikroskopischer und phasenkontrastmikroskopischer Aufnahme desselben Bildausschnitts erzeugt.

Je Stamm und Kombilösung wurde das Keimverhalten von 250 zufällig ausgewählten Konidien bzw. Keimschläuchen am erzeugten Overlay bestimmt. Zu jedem Aufnahmezeitpunkt wurde die Keimrate berechnet und die durchschnittliche Keimschlauchlänge durch Messung der Keimschläuche ermittelt.

6.4.3 Untersuchung der KL-Kombilösungen und *F. falciforme* und *F. petroliphilum* nach der DIN EN ISO 14729 – „Stand Alone Test“

Die DIN EN ISO 14729 beinhaltet Prüfverfahren, um die Wirksamkeit von KL-Reinigungslösungen gegenüber Krankheitserregern zu untersuchen. Das Protokoll gliedert sich in einen „Stand Alone Test“, der die untersuchte Reinigungslösungen isoliert bewertet und in einen „Regimen Test“, der die Effektivität der Reinigungslösungen als Bestandteil eines vom Hersteller vorgegebenen Reinigungsprozedere beurteilt.

Bei der Durchführung wurden folgende Abweichungen vom Protokoll vorgenommen:

1. Es wurden nur *F. falciforme* und *F. petroliphilum* getestet.
2. Es wurde nur die höchste Verdünnungsstufe der Konidien suspensionen ausplattiert (10^1 - 10^2 Konidien/ml). Nur in dieser Verdünnung waren die Agarplatten auswertbar.
3. Ein „Regimen Test“ wurde nicht durchgeführt.
4. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die vom Hersteller angegebene Mindestdesinfektionszeit der KL-Kombilösung B von 4 h auf 6 h ausgedehnt, was der Mindestdesinfektionszeit der KL-Kombilösungen A und C entsprach.

Zunächst wurden die Konidien mit DPBS und 0,05% Tween 80 (DPBST) von den PDA-Platten ab gespült und gefiltert (Porengröße von 12 bis 15 μm). Für jeden Stamm wurde eine Ausgangssuspension mit einer Konzentration von 5×10^7 Konidien/ml DPBST hergestellt.

Die Inokulationskontrollen sollen zeigen, ob die verwendete Zahl der Konidien den Vorgaben des Protokolls entspricht und wie viele Kolonien ohne den Einfluss einer KL-Kombilösung wachsen. Hierzu wurde jede der sechs Ausgangslösungen 1 : 100.000 in DPBST verdünnt

und dreimal je 100 µl auf drei Sab-Agarplatten ausplattiert. Nach 2 bis 3 Tagen Inkubation bei 20 bis 25 °C wurde die Koloniezahl bestimmt.

Die Rückgewinnungsmediumskontrolle dient als Nachweis dafür, dass die verwendeten Neutralisationslösungen gegen die eingesetzten KL-Kombilösungen neutralisierend wirken. Als Neutralisationslösung kam für die Kombilösung A 10 mM Natriumpyruvat, für Kombilösung B und C kam die Dey–Engley–Neutralization Broth zum Einsatz. Durch diese wird verhindert, dass die im Testverfahren zusammen mit den KL-Kombilösungen ausplattierten Konidien während der nachfolgenden Inkubation weiterhin durch die Kombilösungen im Wachstum beeinträchtigt werden. Die Wirksamkeit der Neutralisationslösungen war ausreichend, wenn nach Inkubation mit der Neutralisationslösung mindestens 50 % der Kolonien im Vergleich zur Inokulationskontrolle gewachsen sind. Dazu wurden die KL-Kombilösungen 1 : 10 mit der entsprechenden Neutralisationslösung verdünnt und 15 min bei RT mithilfe eines Rollenmischers gemischt. Währenddessen wurden die Ausgangssuspensionen der Konidien 1 : 100 mit DPBST verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden nach Ablauf von 15 min Mischzeit je 10 µl entnommen, in die entsprechenden Mischungen aus Kombilösung und Neutralisationslösung gegeben und 15 min bei RT gemischt. Danach wurden aus jedem Röhrchen dreimal je 100 µl entnommen und auf drei Sab-Agarplatten ausplattiert. Die Sab-Agarplatten wurden 2 bis 3 Tage bei 20 bis 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien gezählt und mit den gewachsenen Kolonien der Inokulationskontrolle verglichen.

Für den eigentlichen Test (Abb. 3) wurde jede Ausgangssuspension 1 : 100 mit KL-Kombilösung verdünnt und bei 20 bis 25 °C inkubiert. Jeweils nach 25 %, 50 %, 75 %, 100 % und 400 % der vom Kombilösungshersteller vorgeschriebenen Mindestdesinfektionszeit, also nach 1,5 h, 3 h, 4,5 h, 6 h und 8 h, sowie zusätzlich nach 24 h, wurden aus jeder Verdünnung 1 ml entnommen und in 3 Schritten 1 : 1000 verdünnt. Nach der Inkubation über 15 min bei RT wurden jeweils 100 µl auf 3 Sab-Agarplatten ausplattiert.

Die Sab-Agarplatten wurden für 65 bis 68 h bei 20 bis 25 °C inkubiert und im Anschluss durch Zählung der gewachsenen Kolonien ausgewertet. Da jeder Ausstrich dreifach durchgeführt wurde, wurden Durchschnittswerte der Koloniezahl errechnet. Die errechnete prozentuale Reduktion der Koloniezahl für jeden einzelnen Testzeitpunkt bezieht sich auf die Kolonienzahl der Inokulationskontrolle.

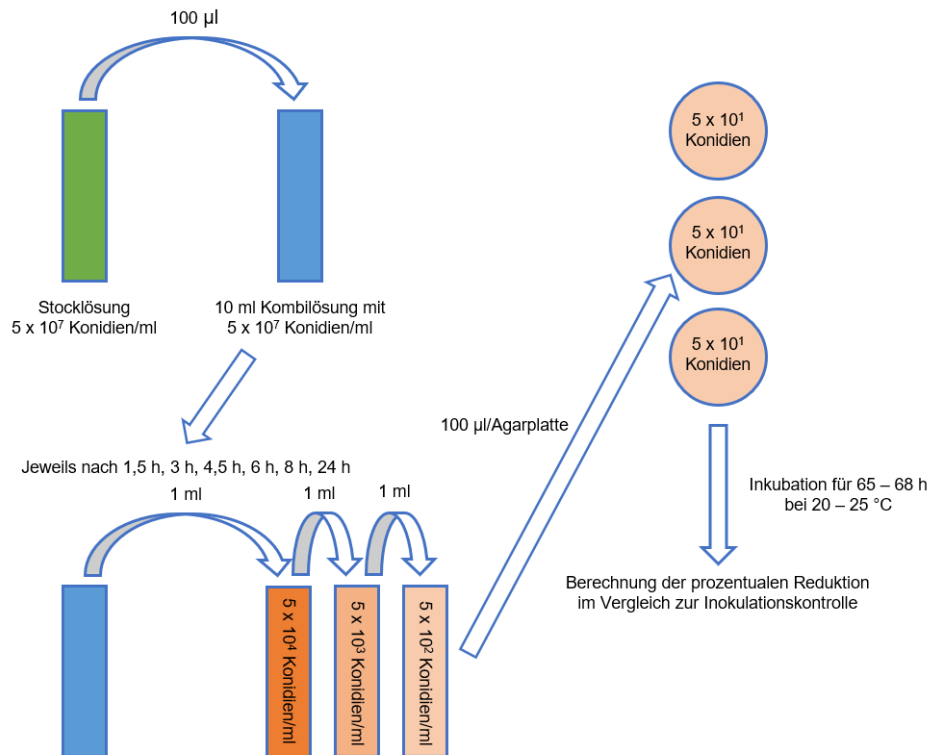


Abb. 3 Testschema der DIN EN ISO 14729 – „Stand Alone Tests“

6.5 Biofilmbildung von *F. falciforme* und *F. petroliphilum* auf KL

Da Biofilme Pathogene vor antimikrobiell wirksamen Substanzen und der Wirkung des Immunsystems schützen können, wurde die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *F. falciforme* und *F. petroliphilum* untersucht. Die Verfahren testeten die Biofilmbildung bei Inkubation von KL in Sab-Bouillon bzw. in den verschiedenen KL-Kombilösungen.

6.5.1 Biofilmbildung in SAB

Bei diesem Versuchsansatz wurde das Protokoll an Imamura et al. (2008) angelehnt, die Inkubationstemperatur der Konidien auf den KL betrug jedoch 25 °C statt 37 °C.

Zunächst wurden die auf Sab-Agarplatten gewachsenen Pilzmyzelien mit 5 – 7 ml Aqua dest. ab gespült und die entstandenen Konidien suspensionen auf eine Konzentration von 1 x 10⁶ Konidien/ml in 15 ml Sab-Bouillon eingestellt. Im Anschluss daran wurden jeweils sechs KL pro KL-Art mit 1x PBS gewaschen und in Wells einer 12-Wellplatte übertragen. Zu den KL wurden dann jeweils 4 ml der eingestellten Konidien suspension gegeben, sodass jeder Stamm zusammen mit jeder KL-Art vorlag.

Nach einer Inkubation von 90 min bei 37 °C wurden die KL wieder mit 1x PBS ab gespült. Hierdurch wurde gewährleistet, dass nur bereits an den KL anhaftende Konidien berücksichtigt

wurden. Die gespülten KL wurden in neue Wells einer 12-Wellplatte mit je 4 ml Sab-Bouillon übertragen.

Nach einer Inkubation von 65 bis 70 h bei 25 °C und 80 U/min erfolgte die Auswertung mittels Kameradokumentation und Mikroskopie der KL, jeweils vor und nach Spülung der KL mit PBS.

6.5.2 Biofilmbildung in KL-Kombilösungen

Dieser Versuch unterscheidet sich nur in den im Folgenden beschriebenen zwei Punkten vom Versuchsansatz 6.5.1.

Insgesamt wurden 36 ml der Konidiensuspension pro Stamm in Sab-Bouillon hergestellt.

Nach der Inkubation von 90 min bei 37 °C und der folgenden Spülung mit PBS, wurden die KL in neue Wells übertragen, in welche jeweils 3 ml der drei unterschiedlichen KL-Kombilösungen vorgelegt waren. So lag jeder Stamm auf jeder Kontaktlinse in jeder Kombilösung vor.

6.6 Zytotoxizitätsbestimmung durch LDH-Freisetzung im Infektionsmodell

Zur Beurteilung der Zytotoxizität von *F. falciforme*, *F. petroliophilum* und *C. albicans* gegenüber FaDu und HCE-2 wurde zunächst ein Infektionsmodell etabliert. Im Modell kamen einschichtig, konfluent gewachsene FaDu- und HCE-2-Zellen zum Einsatz, welche zusammen mit Konidien von *F. falciforme*, *F. petroliophilum* und *C. albicans* inkubiert wurden. Da KL einen schädigenden Einfluss auf die Korneaepithelzellen haben (Liesegang, 2002, Tariq and Koay, 2013) wurden die Epithelzellmodelle nicht nur unter aeroben, sondern auch unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert, um eine hypoxische Schädigung durch KL zu simulieren. Die LDH-Ausschüttung nach einer Inkubationszeit von 15 bis 17 h durch die humanen Zellen diente dabei als Maß für die Zytotoxizität der *Fusarium* spp.

Das „Cytotoxicity Detektion Kit (LDH)“ basiert auf einem photometrisch messbaren Farbumschlag (Abb. 4), der entsteht, wenn die von den humanen Zellen freigesetzte LDH Laktat zu Pyruvat oxidiert und dabei NAD⁺ zu NADH und H⁺ reduziert. Gleichzeitig überträgt das Enzym Diaphorase das überschüssige Wasserstoffatom auf das gelbe Tetrazolium-Salz, welches zu rot gefärbtem Formazan-Salz reduziert wird. Die Menge an Formazan korreliert mit der Menge der von geschädigten Zellen freigesetzten LDH und damit mit der photometrisch gemessenen Zytotoxizität.

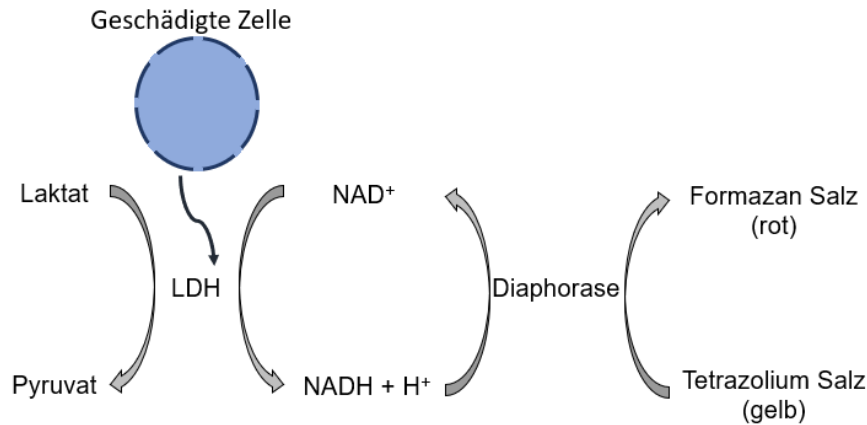


Abb. 4 Funktionsprinzip des „Cytotoxicity Detektion Kit (LDH)“

Die Zellen wurden in ihren Kulturgefäßen bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, vom Flaschenboden abgelöst und pro Stamm in je 3 Versuchsgefäße überführt. Nach wiederholtem Erreichen von Konfluenz wurden frische Konidien mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 0,58 bis 1,73 (Pilzzellen/FaDu- bzw. HCE-2-Zellen = 0,58 bis 1,73) zu den Zellen gegeben. Diese Ansätze wurden sowohl unter aeroben (37 °C, 5 % CO₂) als auch unter mikroaerophilen (37 °C, 25 % Luft und 75 % Gasgemisch) Bedingungen hergestellt und für 15 bis 17 h inkubiert.

Es folgte eine Zentrifugation der Versuchsgefäße bei 250 x g für 10 min. Je 100 µl eines Versuchsgefäßes wurden in ein Well einer neuen 96 Wellplatte übertragen und mit je 100 µl Reaktionsmix des „Cytotoxicity Detektion Kit (LDH)“ versetzt. Nach einer Inkubation von 25 min bei RT und absoluter Dunkelheit wurde je Well 50 µl 1 N HCL als Stoppreagenz hinzugegeben.

Die Absorptionmessungen fanden mit dem ELISA-Reader bei 492 nm und 650 nm statt.

Neben den Proben wurden verschiedene Kontrollen gemessen:

SC1 = Konidien in Versuchsmedium ohne humane Zellen

LC = „Low Control“ (LC) nur aus humanen Zellen und Versuchsmedium

BC = „Background Control“ nur mit Versuchsmedium

HC = „High Control“, aus humanen Zellen in Versuchsmedium und 2 % Triton X-100

Aus allen gemessenen Triplikaten wurden Mittelwerte gebildet. Die Zytotoxizität berechnete sich nach Kalkulation von x für jedes einzelne Isolat nach folgenden Formeln:

$$x = (\text{Absorptionswerte bei } 492 \text{ nm} - \text{Absorptionswerte bei } 650 \text{ nm}) - (\text{BC bei } 492 \text{ nm} - \text{BC bei } 650 \text{ nm}) - (\text{SC1 bei } 492 \text{ nm} - \text{SC1 bei } 650 \text{ nm})$$

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{(x - LC)}{(HC - LC)} \times 100$$

6.6.1 LDH-Freisetzung durch die Pharynxkarzinomzellen

Um herauszufinden, ob sich die Konidien unter aeroben und unter mikroaerophilen Bedingungen unterschiedlich verhalten, wurden zunächst die aeroben Versuche durchgeführt. Dazu wurden in ein Well einer 48 Wellplatte je $3,5 \times 10^4$ Zellen übertragen, in welche 500 μl Wachstumsmedium vorgelegt waren. Die Zellen waren nach ca. drei Tagen konfluent und konnten für den weiteren Versuch verwendet werden. Für die Versuche in mikroaerophiler Umgebung kamen Petrischalen mit 8 cm^2 Grundfläche zum Einsatz. Je Petrischale wurden $4,1 \times 10^5$ Zellen und 2 ml Wachstumsmedium übertragen. Konfluenz erreichten die Zellen nach vier Tagen.

Im Protokoll des „Cytotoxicity Detektion Kit (LDH)“ wurde ein Serumgehalt von $\leq 1 \%$ empfohlen, da FCS selbst LDH enthält und so die Messergebnisse verfälscht werden können. Aus diesem Grund wurde nach Zugabe der Konidien der Anteil von FCS im Wachstumsmedium auf 1 % hitze-inaktiviertes FCS reduziert.

6.6.2 LDH-Freisetzung durch die Korneaepithelzellen

Das Beschichtungsmedium der mikroaerophilen Testgefäße wurde statt mit 1 ml mit drei 3 ml Kollagen Typ I angereichert. Mikroskopisch zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Zellwachstums.

Für die aeroben Versuche kamen beschichtete Wells einer 48 Wellplatte zur Anwendung. In jedes dieser Wells wurde 500 μl Wachstumsmedium vorgelegt und mit 4×10^4 Zellen bestückt. Konfluenz wurde nach drei bis vier Tagen erreicht. Als Testgefäße für die mikroaerophilen Versuche kamen X-Well Objektträger (Sarstedt) mit 8 Zellkammern zum Einsatz, in die je 5×10^4 Zellen und 500 μl Wachstumsmedium gegeben wurden. Die Zellen waren nach drei bis vier Tagen konfluent.

6.7 IL-8 Freisetzung der Korneaepithelzellen im Infektionsmodell

Nach erfolgter Koinkubation der Konidien mit den Korneaepithelzellen im Infektionsmodell (siehe 6.6) wurde für die nachfolgende Messung der IL-8 Ausschüttung aus jedem Testgefäß des Infektionsmodells 200 – 300 µl des Überstands entnommen und bis zur Messung bei -80 °C eingefroren.

Da die Überstände gleicher Isolate eines Versuchs in Triplikaten vorlagen, wurden diese vor der Messung zusammengeführt.

Für die Untersuchungen wurden das IL-8 Human Procataplex™ Simplex- und Basic-Kit, sowie das Messsystem Bio-Plex® 200 verwendet. Diese basieren auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Hersteller.

6.8 Auswertung der Versuche

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander dreimal durchgeführt.

Für die Zellkulturversuche wurden für alle drei Versuche Zellen aus einer Ursprungscharge verwendet.

Die Berechnungen von Mittelwerten und Standardabweichungen sowie die Erstellung der Diagramme wurden mit Microsoft Office Excel 365 durchgeführt.

7 Ergebnisse

7.1 Unterschiedliche Wirksamkeit der KL-Kombilösungen

7.1.1 Inkubation von *Fusarium* spp. in KL-Kombilösungen über Nacht

Zur ersten Beurteilung der Effektivität der drei KL-Kombilösungen, des Verhaltens der verwendeten *Fusarium*-Isolate und des Einflusses der drei unterschiedlichen KL-Sorten wurden die Kontaktlinsen möglichst realitätsnah über Nacht in Suspensionen der Konidien mit den Kombilösungen inkubiert, danach abgespült und auf Sab-Agar inkubiert.

Hier zeigte sich, dass die Konidien aller Isolate nach Inkubation in Kombilösung A weiterhin keimfähig bleiben. Das Wachstum der ausgekeimten Konidien erreichte bei fast allen Stämmen den höchsten erfassbaren Wert (++++) (Abb. 5 A). Auch nach Inkubation in Kombilösung B wiesen alle Isolate keimfähige Konidien und demzufolge Myzelwachstum auf. Mit Ausnahme von *F. falciforme*-Isolat 2015-96, dessen Konidienkeimfähigkeit auch in Kombilösung B unbeeinflusst blieb, zeigten die übrigen Isolate eine reduzierte Keimfähigkeit. Dabei war die Keimfähigkeit der *F. petroliphilum*-Isolate generell stärker eingeschränkt als die der beiden *F. falciforme*-Isolate. Unter den *F. petroliphilum*-Isolaten ist Isolat 2014-22 das mit der größten erhaltenen Keimfähigkeit (Abb. 5 B). Nach nächtlicher Inkubation der Konidien in Kombilösung C zeigten alle Isolate nahezu kein Wachstum mehr (Abb. 5 C). In allen Konstellationen konnten die verwendeten KL das Verhalten der *Fusarium*-Isolate gegenüber den Kombilösungen nicht bzw. nur sehr gering beeinflussen.

Ergebnisse

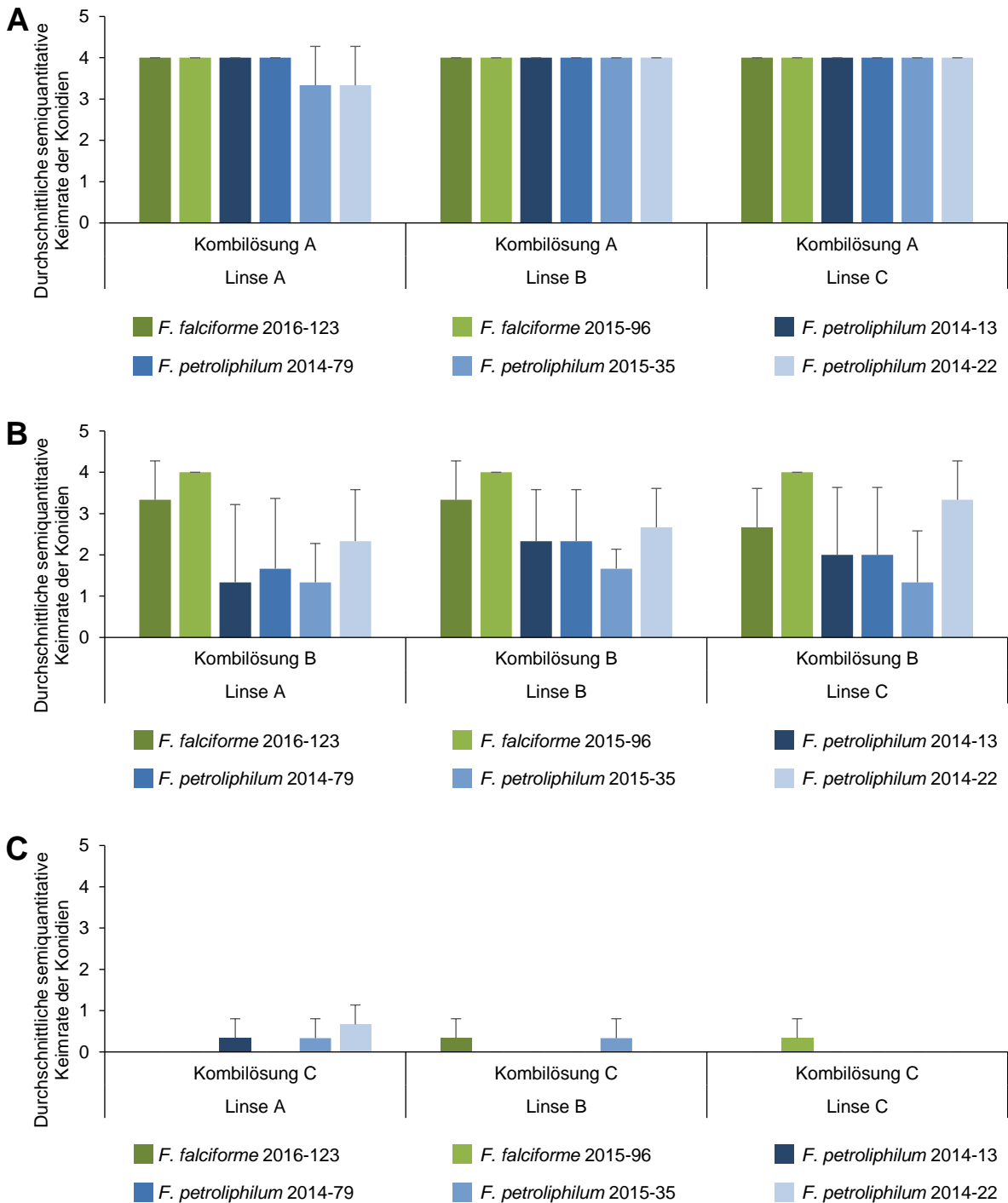


Abb. 5 Einfluss der Kombilösungen und KL-Sorten auf die Keimrate der Konidien

Die mittlere Keimrate der Isolate 2016-123, 2015-96, 2014-13, 2014-79, 2015-35 und 2014-22 wurde in Abhängigkeit von KL-Kombilösung A, B und C, sowie den KL A, B und C semiquantitativ anhand der Zahl der ausgewachsenen Myzelien ermittelt (s. 5.4.1).

- (A) Untersuchung der Isolate in Kombilösung A
- (B) Untersuchung der Isolate in Kombilösung B
- (C) Untersuchung der Isolate in Kombilösung C

7.1.2 Beurteilung der Keimrate und der durchschnittlichen Keimschlauchlänge durch FITC-Färbung

Nach FITC-Färbung und Inkubation der Konidien konnte nur in Kombilösung A eine Auskeimung beobachtet werden (Abb. 7 A bis L). In Kombilösung B und C war im untersuchten Testfeld zu keinem Testzeitpunkt eine Auskeimung der Konidien erkennbar.

In Kombilösung A zeigten die Konidien beider Spp. eine Auskeimung (Abb. 6 A). Dabei waren deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten erkennbar. Über alle Testzeitpunkte zeigte *F. petroliphilum*-Isolat 2014-79 die höchste durchschnittliche Keimrate (nach 47 h 30,9 %). Für alle anderen Isolate lag die Keimrate nach 47 Stunden zwischen 4,7 % und 13,5 % (Abb. 6 B).

Bei der Betrachtung der durchschnittlichen Keimschlauchlänge (Abb. 6 C), wurde die stärkste Keimschlauchbildung für *F. falciforme* 2015-96, gefolgt von *F. petroliphilum* 2014-13 dokumentiert. Die weiteren *F. petroliphilum*-Isolate und *F. falciforme* 2016-123 zeigten ähnliche Keimschlauchlängen.

Ergebnisse

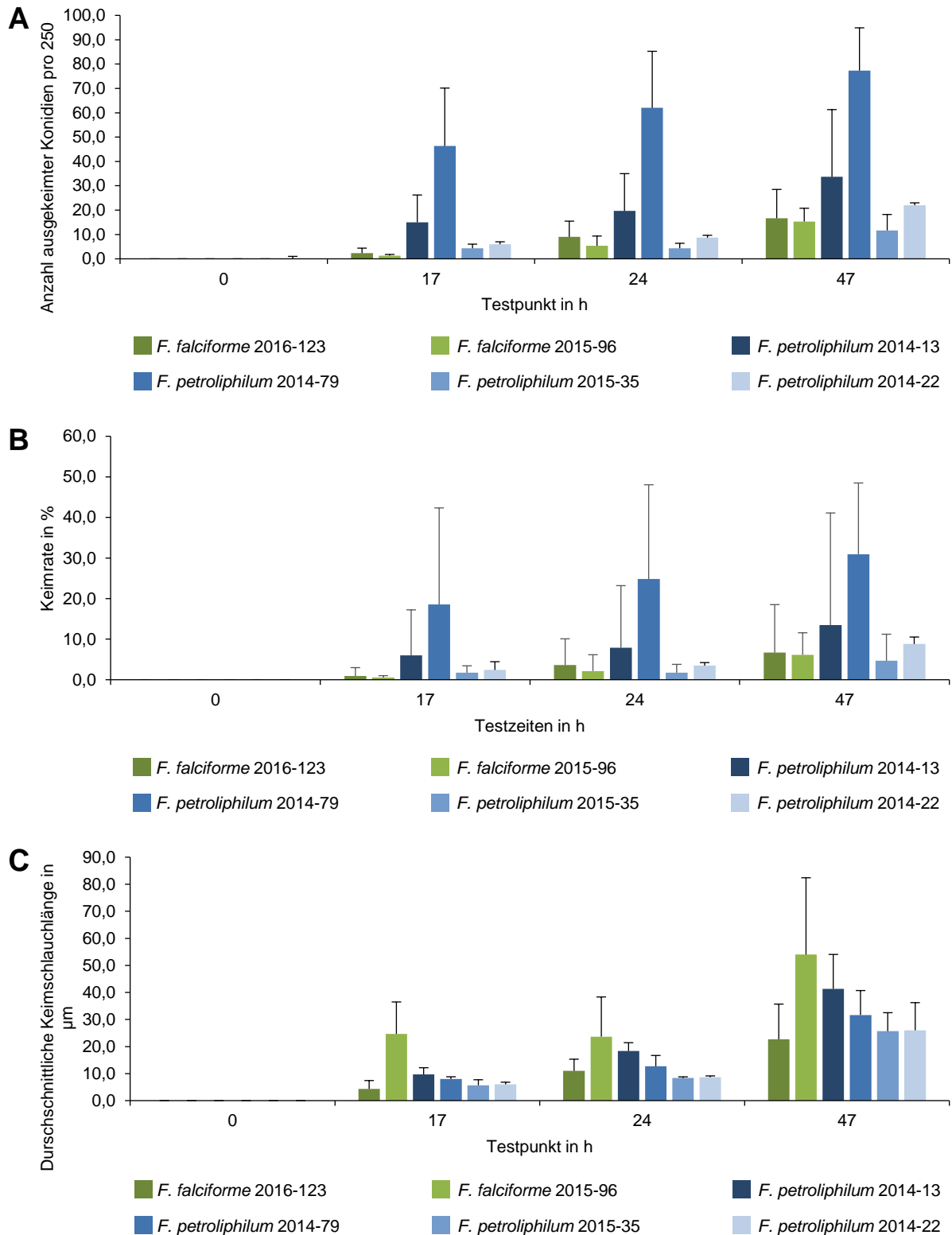
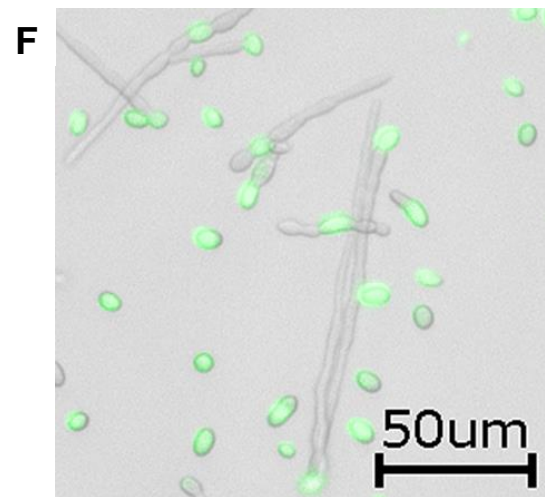
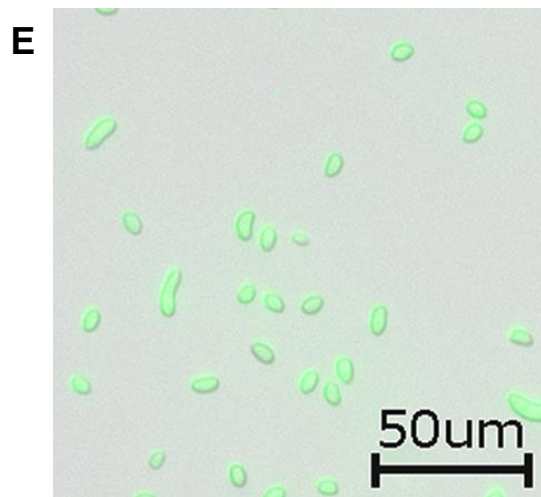
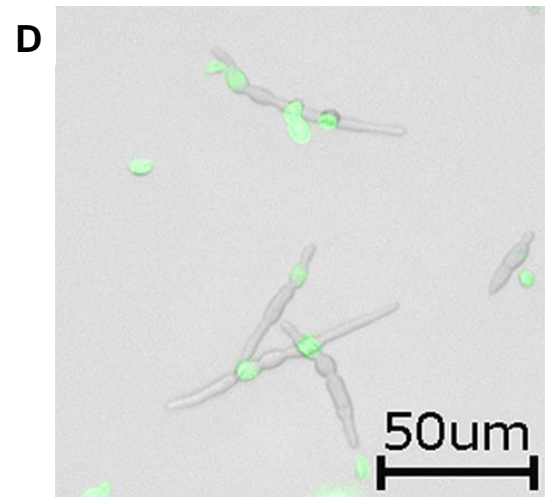
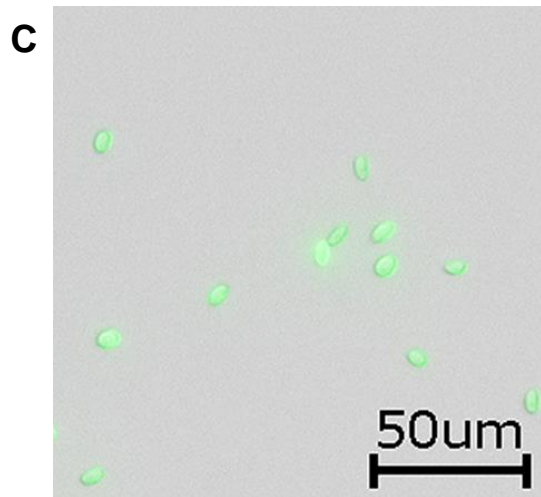
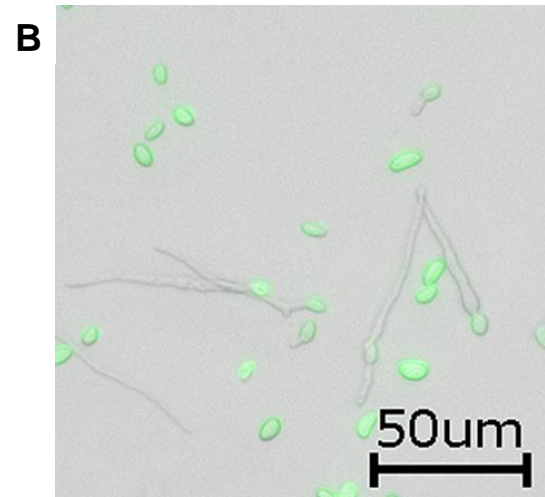
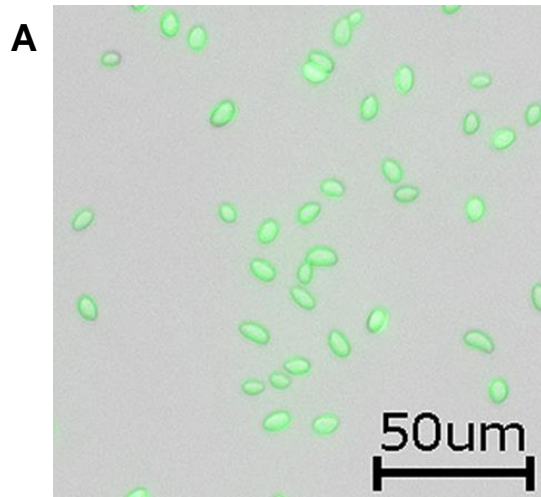


Abb. 6 Auskeimung FITC gefärbter Konidien in Kombilösung A

Zu den Testzeitpunkten $t=0$ h, $t=17$ h, $t=24$ h und $t=47$ h wurden je Isolat (2016-123, 2015-96, 2014-13, 2014-79, 2015-35 und 2014-22) zufällig 250 Konidien gezählt.

- (A) Das Diagramm zeigt für jedes Isolat die Anzahl der ausgekeimten Konidien.
 (B) Aus der Anzahl der ausgekeimten Konidien pro 250 gezählten Konidien wurde die Keimrate berechnet und im Diagramm für jeden Stamm aufgetragen.
 (C) Von den ausgekeimten Konidien wurde für jeden Stamm die gewachsene Keimschlauchlänge je Testzeitpunkt gemessen und ein Durchschnittswert ermittelt.



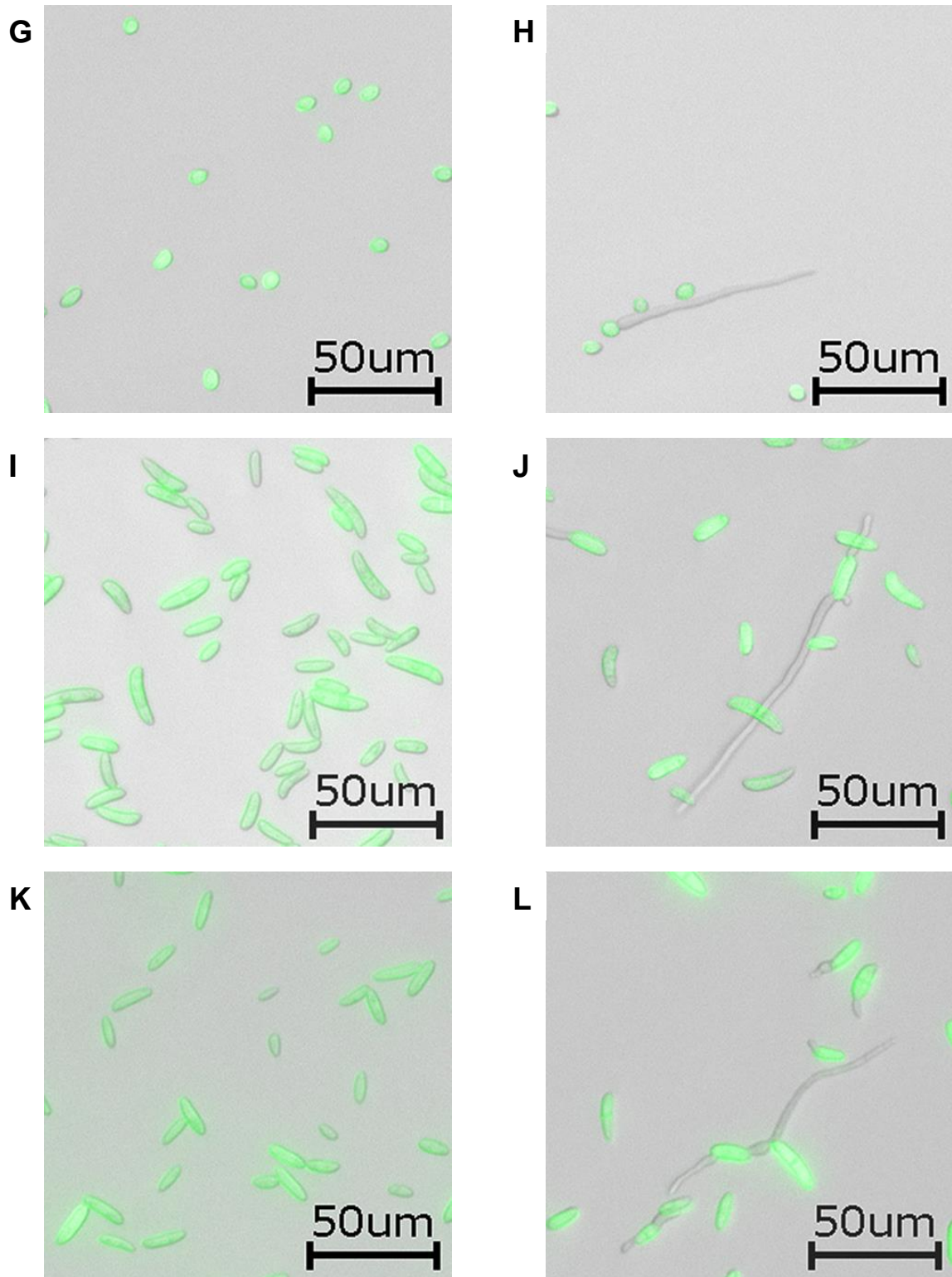


Abb. 7 FITC gefärbte Konidien zum Zeitpunkt 0h und nach 47h in Kombilösung A

Dargestellt sind FITC gefärbte Konidien aller sechs verwendeten Isolate zum Inkubationszeitpunkt 0 h und nach 47 h Inkubation in Kombilösung A bei RT und Dunkelheit. Die Maßstäbe entsprechen 50 µm.

- (A + B) *F. petroliphilum* 2014-13
- (C + D) *F. petroliphilum* 2014-22
- (E + F) *F. petroliphilum* 2014-79
- (G + H) *F. petroliphilum* 2015-35
- (I + J) *F. falciforme* 2015-96
- (K + L) *F. falciforme* 2016-123

7.1.3 Untersuchung der KL-Kombilösungen und *Fusarium*-Isolaten nach der DIN EN ISO 14729 – „Stand Alone Test“

In Versuchsdurchführung zwei war für Stamm 2014-22 in KL-Kombilösung A zum Zeitpunkt 1,5 h nach Inkubation eine Kontamination mit Hefepilzen feststellbar. Da der Zeitpunkt nach 1,5 h nur einen geringen Einfluss auf die Aussage zur Wirksamkeit der KL-Kombilösung besitzt und die Ergebnisse im Vergleich plausibel waren, wurde die einmalige Kontamination nicht berücksichtigt.

Auch der „Stand Alone Test“ zeigte, dass Kombilösung A die geringste Effektivität gegenüber den *Fusarium* spp. besitzt (Abb. 8 A). Die Reduktion beträgt nach den vom Hersteller geforderten 6 h Mindestdesinfektionszeit für *F. petroliphilum* 2014-79 durchschnittlich 37,0 %. Für *F. petroliphilum* 2015-35 ergeben sich negative Werte, weshalb von einer Vermehrung während der Inkubation ausgegangen werden kann. Die Reduktion aller weiteren Isolate bewegte sich zwischen 2 und 13 %. Demnach hätte Kombilösung A für alle Isolate den „Stand Alone Test“ nicht bestanden.

Kombilösung B (Abb. 8 B) verursacht nach 6 h bei *F. falciforme* 2015-96 eine Reduktion von 82,5 % und bei *F. falciforme* 2016-123 von 97,7 %. Gegen alle *F. petroliphilum*-Isolate zeigt Kombilösung B eine Reduktion > 99 %. Auch nach 4,5 h, also 30 min. mehr als die vom Hersteller geforderte Mindestdesinfektionszeit, lag die Reduktion von *F. falciforme* 2015-96 nur bei 76,9 % und für alle weiteren *Fusarium*-Isolate bei > 98 %. Da die Reduktion für alle weiteren Isolate bereits nach 3 h bei > 95 % lag, ist Kombilösung B effektiv gegenüber allen *F. petroliphilum*-Isolaten und *F. falciforme* 2016-123, jedoch nicht ausreichend effektiv gegen *F. falciforme* 2015-96. Für Kombilösung C (Abb. 8 C) konnte bereits nach 1,5 h für alle Isolate eine Reduktion von > 97 % ermittelt werden, die sich im weiteren Verlauf noch steigerte.

Ergebnisse

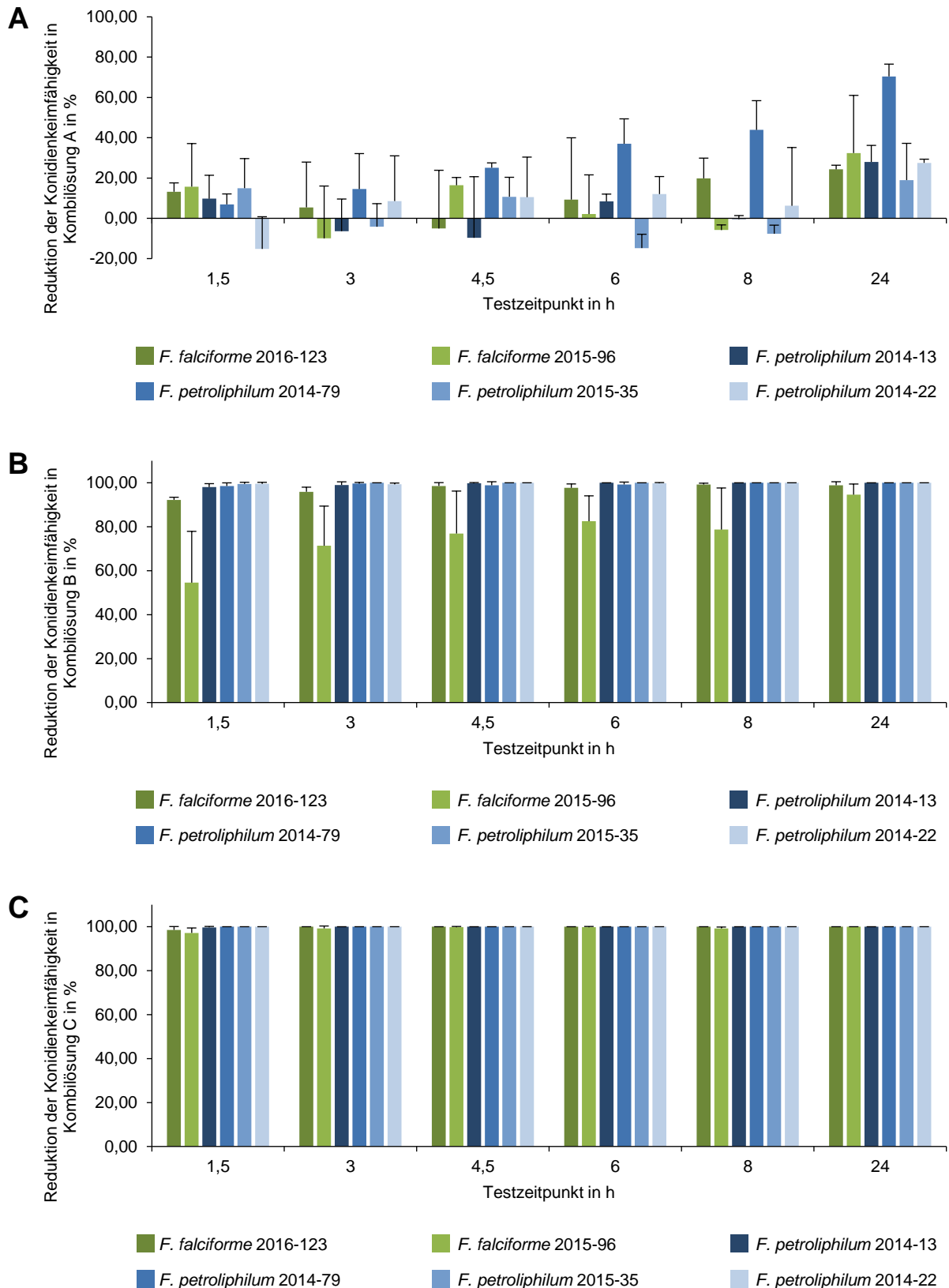


Abb. 8 Mittlere Reduktion der Keimfähigkeit von Konidien in % nach Inkubation in Kombilösungen A, B und C im Stand Alone Test nach der DIN EN ISO 14729

Die Diagramme zeigen die Reduktion der Keimfähigkeit der Isolate 2016-123, 2015-96, 2014-13, 2014-79, 2015-35 und 2014-22 nach Inkubation in Kombilösung A, B und C.

- (A) Reduktion der Isolate in Kombilösung A
- (B) Reduktion der Isolate in Kombilösung B
- (C) Reduktion der Isolate in Kombilösung C

7.2 Biofilmbildung von *Fusarium* spp. auf Kontaktlinsen

7.2.1 Biofilmbildung auf KL C in Sabouraud-Glucose-Bouillon

Nach der Inkubation der Konidien in Sab-Bouillon über 65 bis 70 h auf den verschiedenen KL zeigte sich in allen Wells ein deutliches Myzelwachstum des jeweiligen Isolates. Durch vorsichtiges Spülen der KL mit PBS löste sich das Myzel aller Isolate von KL A und B vollständig ab. Nur KL C wies stammunabhängig ein anhaftendes Myzel auf (Abb. 9).

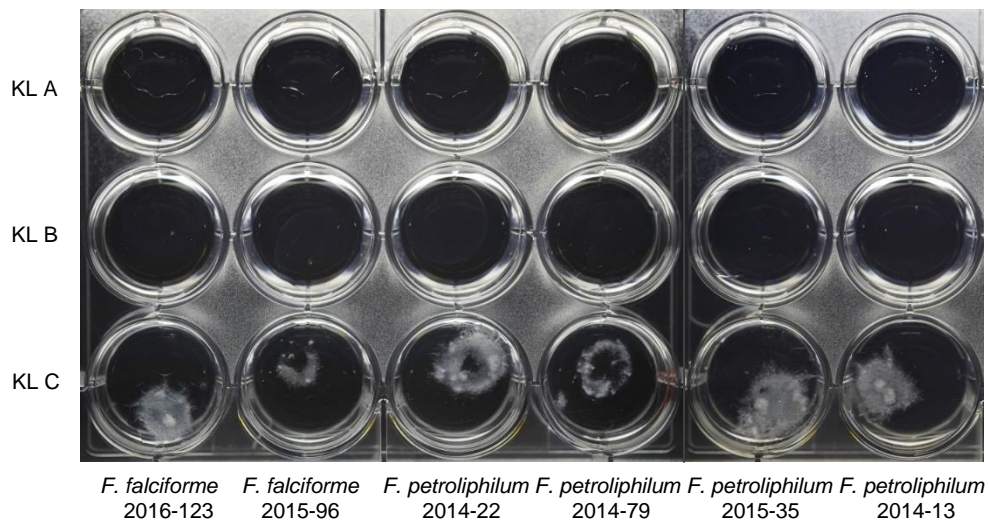


Abb. 9 KL nach Inkubation in Sab-Bouillon mit *Fusarium*-Isolaten und nach Spülung mit PBS

7.2.2 Keine Biofilmbildung auf KL in KL-Kombilösungen

Wie erwartet zeigten nur die Isolate, welche in Kombilösung A inkubiert waren über alle drei Linsenarten hinweg Wachstum eines Myzels (Abb. 10). In Kombilösung B waren mikroskopisch einzelne Auskeimungen sichtbar, Kombilösung C lies keine Auskeimung zu.

Bereits beim Anheben der KL aus Kombilösung A rutschte das Myzel ohne Haftung von den Linsen ab (Abb. 11). Nach Spülung der KL mit den entsprechenden KL-Kombilösungen waren mikroskopisch nur noch einzelne *Fusarium*-Rückstände sichtbar. Auch für die Kombilösungen B und C waren nach dem Spülen mikroskopisch nur noch einzelne Konidien zu sehen.

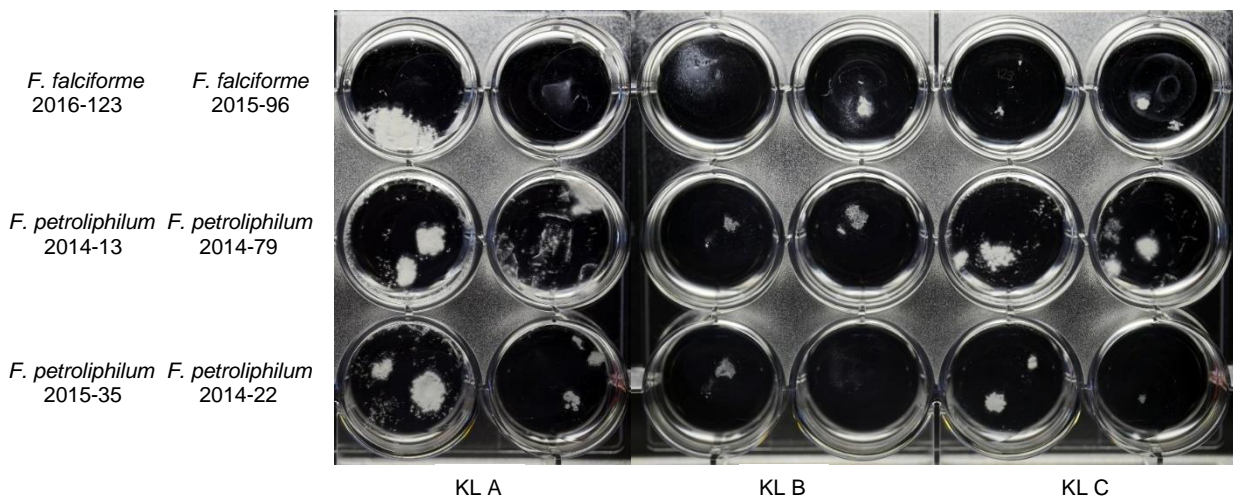


Abb. 10 KL nach Inkubation in Kombilösung A mit *Fusarium*-Isolaten

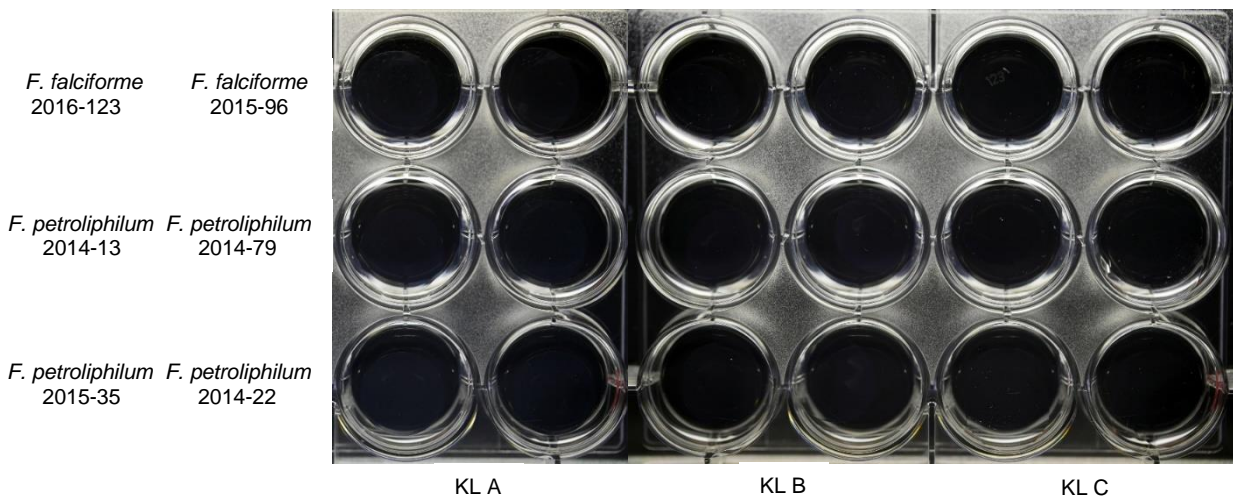


Abb. 11 KL nach Inkubation in Kombilösung A mit *Fusarium*-Isolaten und nach Spülung mit Kombilösung A

7.3 LDH-Freisetzung im Epithelzellmodell durch *Fusarium* spp.

7.3.1 Kein Unterschied bei der Zytotoxizität zwischen *F. petroliphilum* und *F. falciforme* gegenüber Pharynxkarzinomzellen

Zur Etablierung des Versuchs wurde zunächst ein Modell mit FaDu (ATCC® HTB-43™) Pharynxkarzinomzellen verwendet (Abb. 12). Die Zytotoxizität unter aeroben Bedingungen durch die *F. falciforme*-Isolate lag < 6 %, die durch die *F. petroliphilum*-Isolate < 8 %. Unter mikroaerophilen Bedingungen ergab sich für die *F. falciforme*-Isolate eine Zytotoxizität von < 11% und für *F. petroliphilum*-Isolate < 10 %. Auch im Vergleich der Spp. zwischen aeroben und mikroaerophilen Bedingungen ergab sich kein bzw. nur ein sehr geringer Unterschied.

Die Kontrolle bestehend aus *C. albicans* SC5314 verursachte sowohl unter aeroben als auch unter mikroaerophilen Bedingungen im Vergleich zu beiden *Fusarium* spp. deutlich höhere prozentuale Zytotoxizität (aerob 57,8 % und mikroaerophil 71,3 %).

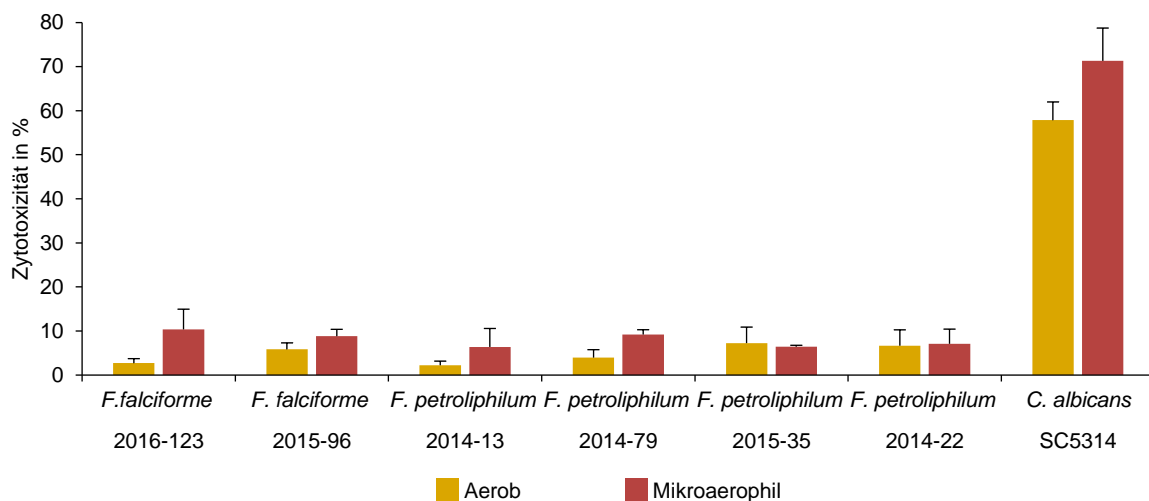


Abb. 12 Zytotoxizität in % der *Fusarium*-Isolate und *C. albicans* SC5314 gegenüber Pharynxkarzinomzellen

7.3.2 Kein Unterschied bei der Zytotoxizität zwischen *F. petroliphilum* und *F. falciforme* gegenüber Korneaepithelzellen

Im Infektionsmodell mit HCE-2 [50.B1] (ATCC® CRL-11135™) (Abb. 13) zeigte sich unter aeroben Bedingungen für die beiden *F. falciforme*-Isolate eine Zytotoxizität zwischen 16,0 und 19,2 % und für die *F. petroliphilum*-Isolate zwischen 7,7 und 21,2 %. Dabei war die gemessene Zytotoxizität für *F. petroliphilum* 2014-79 mit 21,2 % am höchsten. Unter mikroaerophilen Bedingungen wurde für die *F. falciforme*-Isolate eine Zytotoxizität zwischen 8,2 und 12,5 % und für die *F. petroliphilum*-Isolate zwischen 6,8 und 9,3 % (Isolat 2014-22) ermittelt. Für alle

Ergebnisse

Isolate ergab sich unter mikroaerophilen Bedingung eine geringere Zytotoxizität als unter aeroben Bedingungen.

Die Kontrolle durch *C. albicans* SC5314 erzielte wie im Versuch mit den FaDu-Zellen eine höhere Zytotoxizität. Für die aeroben Versuche lag diese bei 64,4 %, unter mikroaerophilen Bedingungen bei 32,2 %.

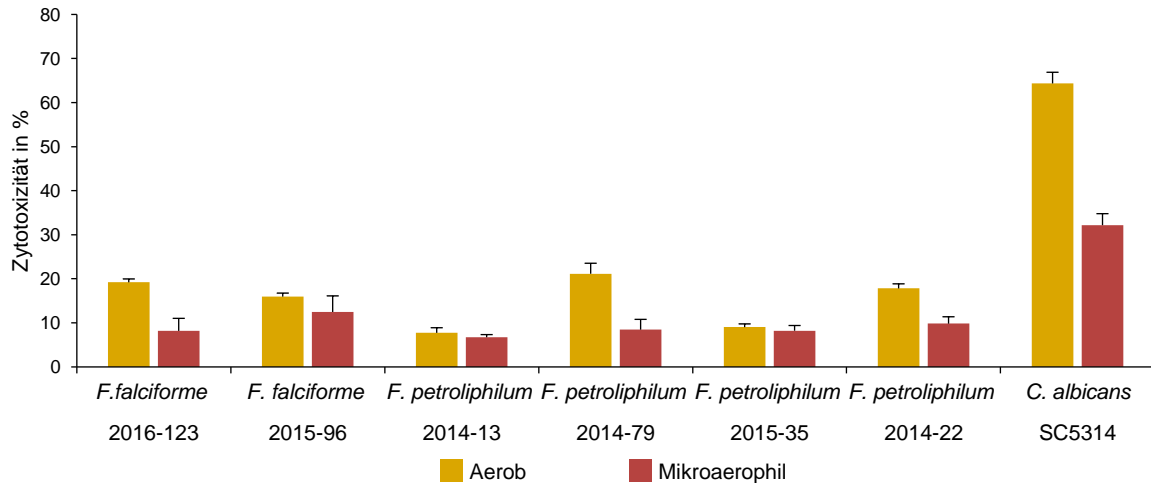


Abb. 13 Zytotoxizität in % der *Fusarium*-Isolate und *C. albicans* SC5314 gegenüber Korneaepithelzellen

7.4 Keine unterschiedliche IL-8-Freisetzung durch Korneaepithelzellen nach Koinkubation mit *F. petroliphilum* und *F. falciforme*

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätsversuche konnten, mit Ausnahme von *F. petroliphilum* 2014-79, in den Überständen der aeroben Versuche höhere Konzentrationen von IL-8 als unter mikroaerophilen Bedingungen gemessen werden (Abb. 14). Unter aeroben Bedingungen lag die Menge an IL-8 für die *F. falciforme*-Isolate zwischen 82 und 131 pg/ml und für die *F. petroliphilum*-Isolate zwischen 3 und 113 pg/ml. Darunter verursachte Isolat 2014-22 mit 113 pg/ml die größte Zytokinausschüttung.

Die Messungen des Zytokins unter mikroaerophilen Bedingungen ergaben für die *F. falciforme*-Isolate Werte zwischen 0 (bzw. negativen Werten) und 66 pg/ml und für die *F. petroliphilum*-Isolate Werte zwischen 0 (bzw. negativen Werten) und 186 pg/ml, wobei diese durch 2014-79 verursacht werden. Die negativen Werte entstanden durch die in Relation zur LC geringere Zytokinausschüttung der mit *Fusarium* spp. koinkubierten Korneaepithelzellen. Die deutliche Standardabweichung bei *F. petroliphilum* 2014-79 unter mikroaerophilen Versuchsbedingungen kam durch einen Ausreißer zustande. Dieser wurde nicht ausgeschlossen, da sämtliche Proben in der Versuchsdurchführung gleichbehandelt wurden.

Für *C. albicans* SC5314 wurden sowohl in den Messungen der aeroben Proben als auch in denen der mikroaerophilen Proben negative Mengen an IL-8 gemessen.

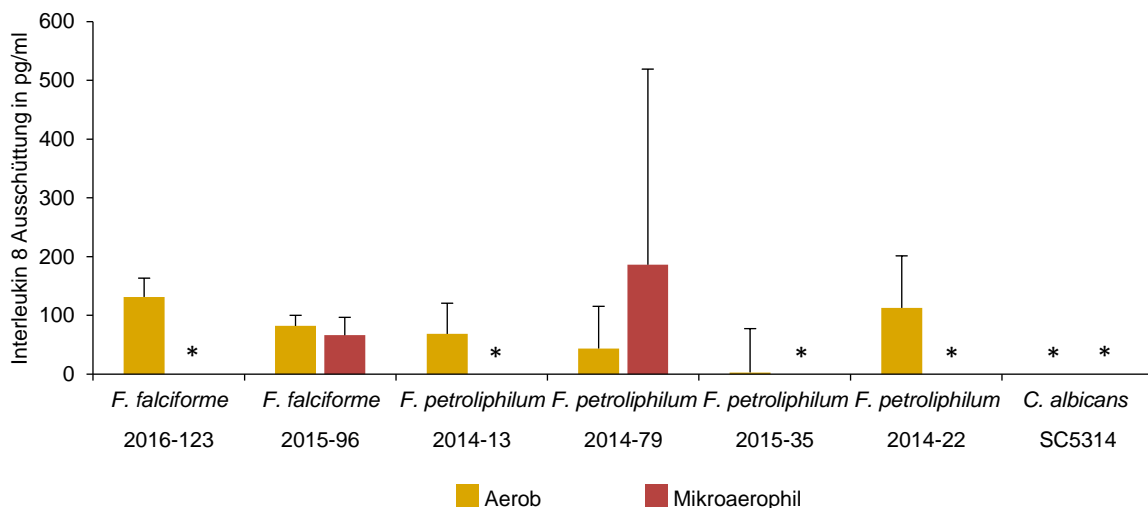


Abb. 14 Zytokinausschüttung der Korneaepithelzellen nach *Fusarium*-Koinkubation

Die mit * gekennzeichneten Messungen der IL-8 Ausschüttung ergaben negative Werte. Diese wurden im Diagramm auf null gesetzt.

8 Diskussion

Für die Versuche wurden klinische *Fusarium*-Isolate der Spp. *F. petroliophilum* und *F. falciforme* verglichen. Beide gehören dem FSSC an. In Fallstatistiken des NRZMyk im Juli 2018 stellten *F. petroliophilum* mit 27 gesicherten Fällen den größten Anteil unter den Spp. des FSSC als Auslöser von KL-assoziierten Augeninfektionen dar. *F. falciforme* hingegen wurde nur in zwei Fällen isoliert und wurde retrospektiv als nicht mit KL, sondern als mit Augentraumata assoziiert eingestuft.

8.1 Ineffektivität der KL-Kombilösung A gegen *Fusarium* spp.

Die wichtigsten Anforderungen an KL-Reinigungslösungen sind bestmögliche Wirksamkeit gegenüber Keimen bei minimaler Zytotoxizität gegenüber den Strukturen des Auges (Santodomingo-Rubido et al., 2006). Da es KL-Reinigungslösungen auf dem Markt gab, die gegenüber Vertretern von *Fusarium* spp. keine oder nur eingeschränkte Effektivität zeigen (Hume et al., 2009, Iguban et al., 2013, Siddiqui et al., 2015), wurden in dieser Arbeit drei verschiedene in Deutschland zum Zeitpunkt der Untersuchung erhältliche KL-Kombilösungen überprüft. Die antimikrobiell wirksamen Bestandteile dieser KL-Kombilösungen unterscheiden sich dabei wesentlich voneinander. Der antimikrobiell wirksame Bestandteil der Kombilösung A ist ein Oxipol[®] genanntes, auf H₂O₂ basierendes System (García-Porta et al., 2015), bei Kombilösung B Polyhexanid und bei Kombilösung C Polyquad[®] (Polyquaternium-1) und Aldox[®] (Myristamidopropyldimethylamine). Auch stellte sich die Frage, ob die Wirksamkeit der hier verwendeten KL-Kombilösungen durch den direkten Kontakt mit weichen KL beeinflusst wird, wie es bereits in ähnlicher Weise von Dannelly & Waworuntu (2004), Shoff et al. (2012) und Gabriel et al. (2018) beschrieben wurde.

In allen Versuchen war Kombilösung A unwirksam gegenüber allen getesteten *Fusarium* spp. Abweichend von den Herstellervorgaben wurden die Versuche nicht im KL-Aufbewahrungsbehälter, sondern in Wells verschiedener Wellplattenformate durchgeführt. Daher kann die vorgelegte Arbeit nicht gänzlich ausschließen, dass dies die Wirksamkeit der KL-Kombilösung verändern könnte. Ein weiterer Hinweis für die Unwirksamkeit der Kombilösung A ist, dass auch Carnt et al. (2018) die Verwendung einer auf Oxipol[®] basierenden Reinigungslösung als Risikofaktor für die zwischen 2012 und 2014 angestiegene Inzidenz für Acanthamoeben-Keratitis in Großbritannien identifizierte. Im Gegensatz zu Oxipol[®] bestehen sonstige H₂O₂-basierte Reinigungslösungen aus einem mehrstufigen Reinigungssystem, das aus einer Reinigungs- und einer Neutralisationsphase besteht. Noch während der Durchführung der Versuche wurde die verwendete Kombilösung A vom Hersteller aus dem Verkauf genommen.

Kombilösung A hat in der durchgeführten DIN EN ISO 14729, den „Stand alone test“ nicht bestanden, wäre aber möglicherweise im Folgenden „Regimen test“, mit dem nicht nur die Kombilösung an sich, sondern das gesamte Reinigungssystem getestet wird, erfolgreich gewesen. Dies bedürfte weiterer Untersuchungen, wenn eine auf Oxipol® basierte KL-Kombilösung erneut im Handel angeboten wird. Gleiches kann auch für Kombilösung B angenommen werden, welche in der durchgeführten DIN EN ISO 14729 – „Stand alone test“ für *F. falciforme* 2015-96 keine, für alle weiteren Isolate aber eine ausreichende Wirksamkeit zeigte. Daraus ließe sich ableiten, dass neu zugelassene KL-Kombilösungen zwingend beide Testbereiche bestehen sollten, damit eine größtmögliche Patientensicherheit vorhanden wäre. Ebenso haben Hume et al. (2009) gezeigt, dass Laborstämme im Vergleich zu klinischen *F. solani* Isolaten eine verminderte Virulenz und Resistenz besitzen. Da für die DIN EN ISO 14729 – „Stand alone test“ auf Laborstämme zurückgegriffen wird, könnte dies zum Bestehen der Kombilösung bei Zulassungstests und schließlich zur Zulassung von Kombilösungen geführt haben, die dann möglicherweise aber nicht gegen klinische Isolate wirksam sind.

Der mangelhaften Wirksamkeit von Kombilösung A und in Teilen von Kombilösung B steht die durchweg gute Wirksamkeit von Kombilösung C gegenüber, die auch in einer KL-Kombilösung mit identischem Wirkstoff von Hume et al. (2009) festgestellt werden konnte. Allerdings gilt anzumerken, dass durch die teils großen Schwankungen zwischen den Isolaten einer Spp. möglicherweise bestehende Unterschiede zwischen den Isolaten und der Wirksamkeit der KL-Kombilösungen nicht aufgedeckt werden konnten. Es ist möglich, dass erst eine größere Zahl an Isolaten pro Spp. quantitative Unterschiede erkennen lassen.

Trotz der in dieser Arbeit geringen Zahl an untersuchten Stämmen wird aber deutlich, dass die Dominanz von *F. petroliphilum* als Erreger von KL-assoziierten Keratitiden nicht auf das Unvermögen von *F. falciforme* in KL- Kombilösungen zu keimen zurückgeführt werden kann, da beide Spp. in KL-Kombilösung A auskeimen konnten. In Kombilösung B war die Auskeimung von *F. falciforme* sogar stärker ausgeprägt als bei *F. petroliphilum*. Die Dominanz von *F. petroliphilum* hat also wahrscheinlich andere Ursachen.

Ebenso kann kein Einfluss der KL auf die Wirksamkeit der KL-Kombilösungen beobachtet werden. Möglicherweise ist die Anzahl der verwendeten Linsentypen im durchgeführten Versuch zu gering, weshalb die von Dannelly et al. (2004), Shoff et al. (2012) und Gabriel et al. (2018) beschriebene Effekte hier nicht gezeigt werden konnten. Nicht getestete Linsentypen könnten den beschriebenen Effekt zeigen bzw. sichtbar machen.

8.2 FITC-Färbung vs. DIN EN ISO 14729 zum Screening von KL-Reinigungslösungen

Ein Vergleich der Versuche ist für ein flächendeckendes Screening verschiedener KL-Kombilösungen und deren Interaktion mit *Fusarium* spp. bezüglich der Kosten, des Materialbedarfs und des Zeitaufwandes interessant. Tab. 8 zeigt eine Gegenüberstellung der DIN EN ISO 14729 und der FITC-Wachstumskontrolle.

Im Gegensatz zur DIN EN ISO 14729 – „Stand alone test“, zeigt die FITC-Färbung der Konidien nur eine Auskeimung nach Inkubation der Konidien in Kombilösung A an. In der DIN EN ISO 14729 – „Stand alone test“ konnte ebenso eine Auskeimung der Konidien in Kombilösung B und C festgestellt werden. Erklärbar wäre dieser Effekt durch die nachfolgende Inkubation der Konidien auf Agarplatte, nachdem diese in KL-Kombilösungen inkubiert wurden und so trotz Inkubation in Kombilösungen ausreichend gute Wachstumsbedingungen herrschten. Die Messungen der Konidien in der FITC-Färbung wurde jedoch direkt während der Inkubation in den KL-Kombilösungen durchgeführt. Daher ist bei der FITC-Färbung keine Aussage darüber möglich, ob die Konidien nach Inkubation in Kombilösungen keimfähig bleiben, wenn diese in eine wachstumsfreundlichere Umgebung gebracht werden. Die DIN EN ISO 14729 kann hierzu eine Aussage treffen und bildet damit das realistischere Szenario ab.

Zusätzlich ist die Aussagekraft der DIN EN ISO 14729 – „Stand alone tests“ höher zu bewerten, da er auf einem vielfach erprobten und standardisierten Verfahren basiert. Ebenso können die Ergebnisse besser mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen verglichen werden, da sich bisherige Studien auf dieses Prüfverfahren beziehen (Hume et al., 2009, Iguban et al., 2013, Siddiqui et al., 2015). Die FITC-Wachstumskontrolle basiert im Vergleich dazu auf einem in unserer Arbeitsgruppe von Meinhardt (2011) etablierten und abgewandelten Verfahren, wodurch die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen erschwert ist.

Auch bei der zufälligen Auszählung der Konidien bei der FITC-Färbung ist eine Untersucherabhängigkeit anzunehmen und eine gezielte Einflussnahme durch die auswertende Person nicht auszuschließen. Zweitere könnte reduziert werden, wenn die Auswertung ohne Kennzeichnung der untersuchten Reinigungslösung und von einer bisher unbeteiligten Person durchgeführt werden würde. Nachteilig ist zudem die Ungenauigkeit des Verfahrens in den ersten Stunden der Versuchsdurchführung. Dadurch kann die vom Hersteller der Reinigungslösungen geforderten Mindestdesinfektionszeiten im Test nicht unbedingt abgebildet werden.

Für die Durchführung eines breiteren Screenings mit 20 *Fusarium*-Isolaten und 6 KL-Reinigungslösungen mit FITC-Wachstumskontrolle ist die nötige Arbeitszeit etwa 1,5-mal höher als mit der DIN EN ISO 14729 – „Stand alone test“. Dies sollte bei der Beurteilung der

tatsächlichen Gesamtkosten zusätzlich berücksichtigt werden. Nichtsdestotrotz sind die Material-Anschaffungskosten beim Test mit FITC-Färbung 3,3-mal und bezogen auf die tatsächlichen Verbrauchskosten sogar 10-mal geringer als die Kosten der DIN EN ISO 14729 – „Stand alone tests“. Dies spiegelt sich auch im Materialverbrauch wider. Für die DIN EN ISO 14729 – „Stand alone test“ werden 2300 Sab-Agarplatten und ca. 1900 15 ml Probenröhrchen verbraucht, was im Vergleich zum FITC-Wachstumskontrolle mit 108 nötigen Sab-Agarplatten, 450 2 ml Mikroreaktionsröhrchen und 20 12-Wellplatten deutlich mehr ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Test mit FITC-Färbung für ein orientierendes Screening zur Wirksamkeit von Reinigungslösungen mit größerem Probenumfang und begrenztem Budget geeignet ist. Daneben besteht allerdings die Gefahr, dass teilweise wirksame Kombilösungen, wie z. B. Kombilösung B, nicht erfasst werden. Die DIN EN ISO 14729 – „Stand alone test“ sollte zur Validierung der Ergebnisse aus der FITC-Färbung mit geringerem Probenumfang genutzt werden, da die Ergebnisse wegen des standardisierten Vorgehens besser mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbar und weniger fehleranfällig sind und das Verhalten verschiedener Isolate und KL-Kombilösungen besonders im Bereich kürzerer Inkubationszeiten besser erfasst werden kann.

Tab. 8 Vergleich der DIN EN ISO 14729 gegenüber der FITC-Färbung von Konidien

Vergleich beider Verfahren zur Untersuchung eines Pilzisolates mit einer KL-Kombilösung vs. sechs Pilzisolaten mit 20 Kombilösungen. Die Kosten basieren auf den im hier durchführenden Labor üblichen Bezugspreisen. Die Preise ohne Klammer stellen die Anschaffungspreise in den zur Verfügung stehenden Packungsgrößen und die Preise in Klammer den tatsächlich verbrauchten Materialwert dar (Preise Stand Juli 2018).

Versuch	DIN EN ISO 14729	FITC-Kontrolle	DIN EN ISO 14729	FITC-Kontrolle
	1 Isolat	1 Isolat	6 Isolate	6 Isolate
	1 Kombilösung	1 Kombilösung	20 Kombilösungen	20 Kombilösungen
Material	- 6 x PDA	- 6 x Sab-Agar	- 108 x PDA	- 108 x Sab-Agar
	- 30 x Sab-Agar	- 9 ml x Sab-Bouillon	- 2300 x Sab-Agar	- 80 ml x Sab-Bouillon
	- 108 ml Neutralisationslösung	- Ca. 20 x 2 ml Mikroreaktionsgefäß	- 12960 ml Neutralisationslösung	- Ca. 450 x 2 ml Mikroreaktionsgefäß
	- 27 x 15 ml Probenröhrchen	- 1 x 12 Wellplatte	- 1872 x 15 ml Probenröhrchen	- 60 x 12 Wellplatte
Kosten	180 – 380 € (40 €)	95 € (35 €)	ca. 2700 € (2500 €)	ca. 800 € (250 €)
Zeit	4 – 5,5 h	4,5 – 5 h	29 – 38 h	48 – 60 h
	(plus 10 – 15 Tage zur Anzucht der Pilze)	(plus 3 – 4 Tage zur Anzucht der Pilze)	(plus 10 – 15 Tage zur Anzucht der Pilze)	(plus 3 – 4 Tage zur Anzucht der Pilze)

8.3 Kein Nachweis von Biofilmbildung auf KL nach Inkubation in KL-Kombilösung

Biofilmbildung durch *Fusarium* spp. wird mehrfach in der Literatur beschrieben (Imamura et al., 2008, Mukherjee et al., 2012, Sav et al., 2018). Auch wird Vertretern von *Fusarium* die Fähigkeit zugeschrieben, auf KL und in KL-Aufbewahrungsbehältern Biofilme bilden zu können (Imamura et al., 2008, Mukherjee et al., 2012). Diese Fähigkeit wird auch mit dem Ausbruch von kontaktlinsenassoziierten Augeninfektionen durch *Fusarium* spp. von Mitte Juni 2005 bis Mitte Juni 2006 in Verbindung gebracht (Chang et al., 2006). Die Biofilmbildung durch *Fusarium* spp. auf KL bietet eine Erklärung dafür, wie diese der desinfizierenden Wirkung durch KL-Reinigungslösungen entgehen (Imamura et al., 2008) und gleichzeitig eine ausreichend große Anzahl von keimfähigen Konidien zusammen mit der Kontaktlinse ins Auge gelangen kann.

Obwohl sich der Versuchsaufbau im Vergleich zu Imamura et al. (2008) nur um die Inkubationstemperatur (25 °C, statt 37 °C) und die Auswahl der KL unterscheiden, konnte nur nach Inkubation der KL C mit Konidien in SAB ein anhaftendes Myzel beobachtet werden. In keinem weiteren Fall konnte der Nachweis erbracht werden, dass die untersuchten *Fusarium* spp. auf den getesteten KL Biofilme bilden können. Eine Erklärung könnte sein, dass die getesteten Isolate grundsätzlich nicht zur Biofilmbildung in der Lage sind, was allerdings nicht mit der vorhandenen Literatur übereinstimmt (Imamura et al., 2008, Mukherjee et al., 2012). Diese zeigten, dass KL unterschiedlich starke Biofilmbildung zulassen. Möglicherweise lassen die in unseren Versuchen verwendeten KL keine Biofilmbildung zu, wobei auch Imamura et al. (2008) eine Linse verwendet, die in diesen Versuchen KL C entspricht.

Die in unseren Versuchen festgestellte Myzelbildung auf KL C nach Inkubation in SAB resultierte aber möglicherweise eher aus dem Einfluss der SAB auf die KL, da nach Inkubation der KL C in den KL-Kombilösungen kein anhaftendes Myzel vorhanden war, obwohl es zu einer Myzelbildung in KL-Kombilösung A gekommen ist. Ein weiteres Indiz für den Einfluss der SAB könnte die beobachtete Verformung der KL A und C nach Inkubation in SAB sein. Womöglich verändert der saure pH-Wert der SAB das KL-Material, wodurch sich die KL verändert und eine Haftung der auskeimenden Konidien ermöglicht wird. Dies bedarf aber weiterer Untersuchungen.

8.4 Messbare Zellschädigung durch *Fusarium* spp. in Infektionsmodellen

Das Prinzip der LDH-Freisetzung aus Zielzellen zur Beurteilung der Zellzerstörung war in der Arbeitsgruppe bereits etabliert (Martin et al., 2011, Bohringer et al., 2016). Die nun verwendeten Infektionsmodelle haben gezeigt, dass durch die Messung der LDH-

Ausschüttung aus den Pharynxkarzinom- und Korneaepithelzellen eine Beurteilung der Zytotoxizität durch *Fusarium* spp. und *C. albicans* SC5314 möglich ist. Dabei zeigt *C. albicans* wie erwartet und in der Literatur vorbeschrieben gegenüber beiden Epithelzellen gleichermaßen hohe Zytotoxizität (Martin et al., 2011, Silva et al., 2011). Die Schädigung durch die *Fusarium*-Isolate ist geringer, liegt aber unter verschiedenen Bedingungen zwischen deutlich messbaren 2,2 und 21,2 %. In keinem Versuchsaufbau waren eindeutige Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität zwischen den *Fusarium* spp. erkennbar.

Das Vorhandensein einer Schädigung des Epithels wird als nötige Komponente gesehen, damit der Pilz die Kornea infiltrieren kann (Green et al., 2008, Gopinathan et al., 2009, Kalkanci and Ozdek, 2011). Eine ähnliche Pathogenese wird auch bei der Entstehung von Keratitiden durch Bakterien oder andere Pilze angenommen (Gopinathan et al., 2009, Rachwalik and Pleyer, 2015). Um den schädigenden Einfluss von KL auf die oberen Epithelzellschichten zu untersuchen (Liesegang, 2002, Tariq et al., 2013), wurden durch die Inkubation der Zellen in mikroaerophilem Milieu die hypoxischen Bedingungen unter weichen KL simuliert. Der durch die mechanische Irritation der KL ausgelöste Epithelschaden wurde bei diesem Versuchsaufbau allerdings nicht berücksichtigt. Dieser kann aber einen entscheidenden Einfluss auf die Barrierefunktion der Epithelzellen haben und sollte daher in weiteren Experimenten untersucht werden.

Eine Erklärung für die im Vergleich zu *C. albicans* deutlich geringere Zytotoxizität könnte die Auswahl der verwendeten Epithelzellen liefern. Die gewählten FaDu (ATCC® HTB-43™)-Pharynxepithelzellen entstammen einem Karzinom. Diese sind also hinsichtlich Zellteilung und Zellüberleben sowie weiterer Faktoren im Vergleich zu gesunden Zellen verändert. Daneben gehören Pharynxepithelzellen auch in vivo nicht zum klassischen Infektionsgebiet von *Fusarium* spp. Bei der verwendeten Korneazellreihe HCE-2 [50.B1] (ATCC® CRL-11135™) handelt es sich um eine mit einem Ad12-SV40 Hybrid-Virus immortalisierte Epithelzelllinie. Diese ist speziell für ein längeres Überleben in Kultur gezüchtet worden (Kahn et al., 1993) und könnte daher auch ein anderes Verhalten gegenüber Pathogenen zeigen als primäre Korneaepithelzellen. Zusätzlich kann auch die Einschichtigkeit des Epithels einen Einfluss haben, da es sich stark von einem dreidimensionalen Korneamodell bzw. dem Aufbau einer humanen Kornea unterscheidet und eine Interaktion der Zellen im mehrschichtigen Verbund fehlt.

Auch könnte für die *Fusarium* spp. die Inkubationszeit oder die Infektionsdosis (MOI) zu gering gewählt worden sein. In dieser Arbeit orientierte sich die Infektionszeit an der täglichen Tragedauer von weichen KL, die Infektionsdosis (MOI = von 0,58 bis 1,73) entsprach einer gängigen Infektionsdosis, bei der von einer messbaren Infektion ausgegangen werden kann, und es nicht zu einer zu starken Überwucherung der Zellen kommt (Boros-Majewska et al., 2015). In Vorversuchen mit dem Pharynxepithelzellmodell konnten bei einer MOI von 1, 5, und

10 keine Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität festgestellt werden. Auf Vorversuche mit den Korneaepithelzellen wurde allerdings aufgrund der geringen Replikationsfähigkeit der Korneaepithelzellen verzichtet. Möglicherweise zeigt eine veränderte MOI bei der Koinkubation mit den Korneaepithelzellen Unterschiede in der Zytotoxizität auf, da diese als nicht-tumoröse Epithelzellen eventuell empfindlicher reagieren.

Unter mikroaerophilen Bedingungen konnte im Modell mit den Pharynxepithelzellen im Vergleich zu den aeroben Bedingungen im Schnitt eine höhere LDH-Freisetzung gemessen werden. Das lässt den Schluss zu, dass eine Vorschädigung die Vulnerabilität der Epithelzellen gegenüber Pathogenen steigert, wobei sich diese Ergebnisse nicht mit denen des Infektionsmodells mit den Korneaepithelzellen decken. Zwar ist die prozentuale Zytotoxizität im Vergleich zum Pharynxepithelzellmodell höher, die Zytotoxizität unter mikroaerophilen Bedingungen lag allerdings entgegen den Erwartungen niedriger als unter aeroben Bedingungen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das verwendete Gasgemisch zur Generierung der mikroaerophilen Bedingungen nicht den realen Bedingungen unter weichen KL entspricht, sondern nur eine Annäherung an ein hypoxisches Milieu darstellt. Auf realistischer simulierter Bedingungen unter weichen KL könnten die Korneaepithelzellen möglicherweise empfindlicher reagieren als die Pharynxepithelzellen und damit stärker geschädigt werden als unter aeroben Bedingungen.

8.5 IL-8 Ausschüttung durch *Fusarium* spp. in den Infektionsmodellen unter aeroben Bedingungen

Korneaepithelzellen stellen die erste zelluläre Schicht am Auge dar. Dabei nehmen sie bei der Immunreaktion am Auge eine wichtige Rolle ein. Korneaepithelzellen können IL-8 freisetzen (Cubitt et al., 1993, Zhang et al., 2005), welches als ein potenter Botenstoff zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und damit des angeborenen Immunsystems gilt.

Um die Aussagekraft des Zytotoxizitätsexperimentes zu stärken, wurde im nächsten Schritt die IL-8 Freisetzung der Korneaepithelzellen nach Koinkubation mit *Fusarium* spp. untersucht. Bei den Ergebnissen fiel auf, dass sowohl unter aeroben als auch unter mikroaerophilen Bedingungen eine ausgeprägte IL-8 Ausschüttung in der LC, also den Epithelzellen ohne Beeinflussung durch die *Fusarium* spp. gemessen wurde. Unter aeroben Bedingungen fiel diese aber im Schnitt geringer aus als die gemessene IL-8 Ausschüttung nach Koinkubation mit den *Fusarium* spp. Daher kann von einer durch die Koinkubation mit den *Fusarium* spp. getriggerten IL-8 Ausschüttung durch die Korneaepithelzellen unter aeroben Bedingungen ausgegangen werden.

In den Testkonstellationen unter mikroaerophilen Bedingungen, mit Ausnahme von *F. petroliphilum* 2014-79 und *F. falciforme* 2015-96, lag die IL-8 Ausschüttung der LC über der IL-8 Ausschüttung der Korneaepithelzellen nach Koinkubation mit *Fusarium* spp. Daher ist die isolierte Beurteilung der IL-8 Ausschüttung der Korneaepithelzellen durch die Koinkubation mit *Fusarium* spp. unter den hier verwendeten mikroaerophilen Bedingungen nicht möglich. Auch hier müsste daher ein mikroaerophiles Milieu verwendet werden, wie es realistischerweise unter weichen KL entsteht. Nur so könnte der Einfluss der tatsächlichen hypoxischen Bedingungen bei Koinkubation mit *Fusarium* spp. aussagekräftig beurteilt werden. Die hohen Werte für die IL-8 Ausschüttung bei der LC, sowohl unter aeroben als auch unter mikroaerophilen Bedingungen lassen möglicherweise auf einen hohen „Zellstress“ im verwendeten Zellmodell schließen. Andere Epithelzellmodelle oder primäre Epithelzellen könnten möglicherweise unter aeroben, als auch unter mikroaerophilen Bedingungen eine geringere IL-8 Ausschüttung in der LC zeigen und die Ergebnisse nach Koinkubation mit *Fusarium* spp. aussagekräftiger erscheinen lassen.

Nach Koinkubation der Korneaepithelzellen mit *C. albicans* zeigte sich ebenfalls eine IL-8 Ausschüttung unterhalb der Nachweisgrenze. Zwar kann die IL-8 Ausschüttung unter mikroaerophilen Bedingungen nicht abschließend beurteilt werden, unter aeroben Bedingungen hätte man jedoch aufgrund der starken LDH Freisetzung der Zellen nach *C. albicans*-Infektion eine die LC übertreffende Zytokinantwort erwartet. Grund für die Abweichung könnte eine zu schnelle und zu umfangreiche Zytotoxizität durch *C. albicans* sein, wodurch die Zellen vor ihrem Untergang nicht genügend Zeit hatten IL-8 freizusetzen. Dieser Effekt könnte wiederum durch eine geringere MOI beeinflusst werden.

8.6 Kein physiologischer Unterschied zwischen *F. petroliphilum* und *F. falciforme* messbar

Obwohl Fallzahlen des NRZMyk und eine Studie von O'Donnell et al. (2007) Unterschiede in der Infektionshäufigkeit der Spp. zeigen, konnten keine nachweisbaren physiologischen Unterschiede der beiden Arten gegenüber den eingesetzten KL-Kombilösungen festgestellt werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass der Grund für die unterschiedliche Infektionshäufigkeit der Spp. an anderer Stelle zu finden ist.

Für verschiedene Vertreter des FSSC wurde ein Vorkommen in Waschbecken und Abwasserleitungen von Duschen beschrieben (Chang et al., 2006, Mehl et al., 2008). Ein Grund für das gehäufte Auftreten von bestimmten *Fusarium* spp. als Auslöser von KL-assoziierten Augeninfektionen könnte demnach sein, dass z. B. *F. petroliphilum* in häuslichen Wassersystemen vorkommt und *F. falciforme* nicht (Walther et al., 2018). So wäre *F.*

petroliphilum in der Lage, beim Handling mit den KL in Kontakt mit Wasser oder dem Wassersystem zu kommen. Zwar raten die Hersteller von KL-Reinigungslösungen den Kontakt der gereinigten KL mit Wasser unbedingt zu vermeiden, jedoch finden die Reinigung und das Wechseln von KL in der Praxis üblicherweise im Badezimmer und damit in unmittelbarer Nähe zum Wassersystem statt. Des Weiteren ist beschrieben, dass KL-Träger/innen sich häufig nicht an die vom Hersteller vorgegebenen Handlungsanweisungen halten (Lam et al., 2002, Stapleton et al., 2007, Keay et al., 2008), was die Desinfektionsleistung der KL-Kombilösungen reduziert und das Risiko von Infektionen erhöht.

Ebenso könnte die Morphologie der Konidien beider Spp. zur unterschiedlichen Infektionshäufigkeit beitragen. Es fiel auf, dass sich die gebildeten Konidien nach einer Inkubationszeit von 3 bis 4 Tagen bei 34 °C auf Haferflocken-Agar in ihrer Größe unterscheiden. Die Konidien von *F. falciforme* waren größer. Dies wird auch von Short et al. (2013) beschrieben. Er beschreibt auch, dass *F. petroliphilum* kleinere Konidien bildet. Möglicherweise sind kleinere Konidien hinsichtlich ihrer Virulenz im Vorteil. Auch die mechanische Reinigung der Augenoberflächen durch den Lidschlag, könnte bei kleinen Konidien weniger effektiv sein.

Während der Versuchsdurchführung fiel ein weiterer Unterschied auf. Bei allen Isolaten von *F. petroliphilum* zeigte sich tendenziell eine höhere Anzahl an Konidien, die sich von den Agarplatten haben abschwämmen lassen. Unabhängig von der optimalen MOI im Infektionsmodell erhöht sich bei einer höheren Anzahl an Konidien die Wahrscheinlichkeit, dass diese in Kontakt mit den KL kommen, auf einen bestehenden Korneaschaden treffen und eine Infektion auslösen können.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl kontaktlinsenassoziierte Augeninfektionen durch *Fusarium* spp. zum Verlust des Augenlichtes bei Betroffenen führen können, befinden sich die experimentellen Untersuchungen dazu noch in den Anfängen. Für die Versuche wurden zwei Spp. des FSSC, *F. falciforme* und *F. petroliphilum*, verwendet. Infektionen durch *F. falciforme* scheinen nicht KL-assoziiert, sondern Trauma assoziiert zu sein, während *F. petroliphilum* häufig Infektionen des Auges in Verbindung mit weichen KL hervorruft.

Durch die Versuchsdurchführung konnte gezeigt werden, dass eine der drei getesteten KL-Kombilösungen nicht effektiv wirksam gegen die beiden *Fusarium* spp. ist. Um eine umfassendere Aussage über die Wirksamkeit von KL-Reinigungslösungen treffen zu können, sollte in weiteren Forschungsarbeiten ein größeres Spektrum verschiedener Reinigungslösungen auf ihre Effektivität gegenüber *Fusarium* spp. hin untersucht werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass zum groben Screening die FITC-Wachstumskontrolle und zur darauffolgenden genauen Untersuchung auffälliger Reinigungslösungen der DIN EN ISO 14729 „Stand Alone Test“ verwendet werden kann. Möglicherweise treten durch Wirkstoffe anderer Reinigungslösungen Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit zwischen den *Fusarium* spp. auf, die durch die begrenzte Anzahl von drei Kombilösungen nicht erfassen werden konnten. Außerdem könnten weitere nicht wirksame Reinigungslösungen identifiziert werden.

Eine Biofilmbildung konnte auf den KL nach Inkubation in KL-Kombilösung nicht beobachtet werden, obwohl dies vielfach beschrieben ist. Weitere *Fusarium*-Isolate und KL-Sorten sollten in zukünftigen Untersuchungen herangezogen werden. So könnte beurteilt werden, inwieweit verschiedene *Fusarium* spp. zur Biofilmbildung in unterschiedlichen Situationen fähig sind, und wie sich diese Daten mit bereits vorhandenen decken.

Bei der Messung der Zytotoxizität zeigte sich in beiden in dieser Arbeit verwendeten Infektionsmodellen eine im Vergleich zu *C. albicans* schwächere, aber eine sowohl unter aeroben als auch unter mikroaerophilen Bedingungen messbare Zellschädigung. Zusätzlich konnte unter aeroben Bedingungen als Reaktion der Korneaepithelzellen auf die Koinkubation mit den *Fusarium* spp. eine IL-8 Ausschüttung gemessen werden. Unter mikroaerophilen Bedingungen überstieg die IL-8 Ausschüttung der LC jedoch die gemessene IL-8 Ausschüttung der mit *Fusarium* spp. koinkubierten Epithelzellen. Die IL-8 Ausschüttung besitzt wiederum großen Einfluss auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und damit auf den Beginn einer Immunreaktion. Als weiterführende Untersuchung könnten *Fusarium* spp. mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut gesunder Spender konfrontiert werden und die Ausschüttung von Zytokinen gemessen werden. Da neutrophile Granulozyten selbst in der Lage sind eine Vielzahl an Zytokinen in großen Mengen freizusetzen, ist anzunehmen, dass

die Messergebnisse höher liegen könnten als die der Korneaepithelzellen und sich Unterschiede zwischen den *Fusarium* spp. eventuell besser darstellen ließen.

Die hier neu erworbenen Erkenntnisse können helfen, zukünftige Versuchsanordnungen zu verbessern. Zytotoxizitäts- und Zytokinversuche, die mit dreidimensionalen Modellen oder gar mit primären Korneaepithelzellen durchgeführt werden, können realitätsnähere Bedingungen schaffen und damit weitere Erkenntnisse erbringen. Daneben könnte eventuell auch die Verwendung von KL auf den Zellmodellen anstelle des als Annäherung genutzten mikroaerophilen Milieus in den Zytotoxizitäts- und IL-8-Versuchen Unterschiede zwischen den *Fusarium* spp. aufzeigen. Untersuchungen in Bezug auf das Erregerreservoir der beiden *Fusarium* spp. könnten entscheidende Hinweise liefern, weshalb bestimmte Spp. gehäuft bei KL-Träger/innen Infektionen des Auges hervorrufen und andere nicht.

Auch das Vorhandensein von besonders kleinen Mikro- oder Makrokonidien könnte einen Einfluss auf die Pathogenese von Augeninfektionen durch *Fusarium* spp. zu haben. Dies könnte in weiteren Versuchen gezielt untersucht werden. Dadurch wäre es eventuell möglich, eine Aussage zu treffen, ob bestimmte Spp., die in der Umgebung von Menschen besonders häufig vorkommen, eine Auffälligkeit bei der Konidienbildung zeigen, und ob diese Spp. als vorrangige Erreger für Keratitiden identifiziert werden können.

Außerdem ist es von entscheidender Bedeutung, höhere Fallzahlen, also mehr *Fusarium*-Isolate, in die Untersuchungen einzubeziehen, wofür sicherlich ein größerer Aufwand und Kooperationen erforderlich wären. Hierdurch könnten die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse und die auf deren Basis abgeleiteten Thesen statistisch detaillierter untersucht und überprüft werden.

10 Literaturverzeichnis

- Abou Shousha M, Santos AR, Oechsler RA, Iovieno A, Maestre-Mesa J, Ruggeri M, Echegaray JJ, Dubovy SR, Perez VL, Miller D, et al. 2013. A novel rat contact lens model for *Fusarium* keratitis. *Mol Vis*, 19, 2596-605.
- Ahearn DG, Zhang S, Stulting RD, Schwam BL, Simmons RB, Ward MA, Pierce GE & Crow SA, Jr. 2008. *Fusarium* keratitis and contact lens wear: facts and speculations. *Med Mycol*, 46, 397-410.
- Al-Hatmi AM, Meis JF & De Hoog GS 2016. *Fusarium*: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. *PLoS Pathog*, 12, e1005464.
- Al-Hatmi AMS, Ahmed SA, Van Diepeningen AD, Drogari-Apiranthitou M, Verweij PE, Meis JF & De Hoog GS 2018. *Fusarium* *metavorans* sp. nov.: The frequent opportunist 'FSSC6'. *Med Mycol*, 56, 144-152.
- Anutarapongpan O, Maestre-Mesa J, Alfonso EC, O'Brien TP & Miller D 2018. Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Screening of Mycotoxin Genes From Ocular Isolates of *Fusarium* species. *Cornea*, 37, 1042-1046.
- Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y & Handa H 1995. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, 614-21.
- Badyal DK & Desai C 2014. Animal use in pharmacology education and research: the changing scenario. *Indian J Pharmacol*, 46, 257-65.
- Behrens-Baumann WJ, Hofmuller W, Tammer I & Tintelnot K 2018. Keratomycosis due to *Tintelnotia destructans* refractory to common therapy treated successfully with systemic and local terbinafine in combination with polyhexamethylene biguanide. *Int Ophthalmol*.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL & Kuchroo VK 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-8.
- Bohringer M, Pohlers S, Schulze S, Albrecht-Eckardt D, Piegsa J, Weber M, Martin R, Hunniger K, Linde J, Guthke R, et al. 2016. *Candida albicans* infection leads to barrier breakdown and a MAPK/NF-kappaB mediated stress response in the intestinal epithelial cell line C2BBE1. *Cell Microbiol*, 18, 889-904.
- Boros-Majewska J, Turczyk L, Wei X, Milewski S & Williams DW 2015. A novel in vitro assay for assessing efficacy and toxicity of antifungals using human leukaemic cells infected with *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*, 119, 177-87.
- Bourcier T, Sauer A, Dory A, Denis J & Sabou M 2017. Fungal keratitis. *J Fr Ophthalmol*, 40, e307-e313.
- Bullock JD, Warwar RE, Elder BL & Khamis HJ 2016. Microbiological Investigations of ReNu Plastic Bottles and the 2004 to 2006 ReNu With MoistureLoc-Related Worldwide *Fusarium* Keratitis Event. *Eye Contact Lens*, 42, 147-52.
- Bullock JD, Warwar RE, Elder BL & Northern WI 2008. Temperature instability of ReNu with MoistureLoc: a new theory to explain the worldwide *Fusarium* keratitis epidemic of 2004-2006. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 106, 117-26; discussion 126-7.
- Carnt N, Hoffman JJ, Verma S, Hau S, Radford CF, Minassian DC & Dart JKG 2018. *Acanthamoeba* keratitis: confirmation of the UK outbreak and a prospective case-control study identifying contributing risk factors. *Br J Ophthalmol*.
- Chang DC, Grant GB, O'donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, Jacobson LM, Crowell CS, Sneed RS, Lewis FM, et al. 2006. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA*, 296, 953-63.
- Cong L, Xia YP, Zhao GQ, Lin J, Xu Q, Hu LT, Qu JQ & Peng XD 2015. Expression of vitamin D receptor and cathelicidin in human corneal epithelium cells during *fusarium solani* infection. *Int J Ophthalmol*, 8, 866-71.
- Couture C, Zaniolo K, Carrier P, Lake J, Patenaude J, Germain L & Guerin SL 2016. The tissue-engineered human cornea as a model to study expression of matrix metalloproteinases during corneal wound healing. *Biomaterials*, 78, 86-101.
- Cubitt CL, Tang Q, Monteiro CA, Lausch RN & Oakes JE 1993. IL-8 Gene Expression in Cultures of Human Corneal Epithelial Cells and Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 3199-3206.
- Dannelly HK & Waworuntu RV 2004. Effectiveness of Contact Lens Disinfectants After Lens Storage. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 30, 163-165.
- Devnarain N, Tiloke C, Nagiah S & Chuturgoon AA 2017. Fusaric acid induces oxidative stress and apoptosis in human cancerous oesophageal SNO cells. *Toxicon*, 126, 4-11.

- Fan J, Urban M, Parker J, Brewer HC, Kelly SL, Hammond-Kosack KE, Fraaije BA, Liu X & Cools HJ 2013. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. *New Phytologist* 198, 821–835.
- Gabriel MM, Mcanally C & Bartell J 2018. Antimicrobial Efficacy of Multipurpose Disinfecting Solutions in the Presence of Contact Lenses and Lens Cases. *Eye Contact Lens*, 44, 125-131.
- García-Porta N, Rico Del Viejo L, Ferreira-Neves H, C. Peixoto-De-Matos S, Queirós A & Gonzalez-Meijome J 2015. Performance of Three Multipurpose Disinfecting Solutions with a Silicone Hydrogel Contact Lens. 2015, 1-13.
- Gaujoux T, Chatel MA, Chaumeil C, Laroche L & Borderie VM 2008. Outbreak of Contact Lens-Related *Fusarium* Keratitis in France. *Cornea* 27, 1018–1021.
- Gillum AM, Tsay EY & Kirsch DR 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*, 198, 179-82.
- Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, Bose N, Chan AS, Magee AS, Danielson ME, et al. 2011. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature*, 472, 471-5.
- Gopinathan U, Sharma S, Garg P & Rao GN 2009. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. *Indian J Ophthalmol*, 57, 273-9.
- Gower EW, Keay LJ, Oechsler RA, Iovieno A, Alfonso EC, Jones DB, Colby K, Tuli SS, Patel SR, Lee SM, et al. 2010. Trends in fungal keratitis in the United States, 2001 to 2007. *Ophthalmology*, 117, 2263-7.
- Green M, Apel A & Stapleton F 2008. Risk Factors and Causative Organisms in Microbial Keratitis. *Cornea* 2008, 27, 22 - 27.
- Hahne M & Reichl S 2011. Development of a serum-free human cornea construct for in vitro drug absorption studies: the influence of varying cultivation parameters on barrier characteristics. *Int J Pharm*, 416, 268-79.
- He D, Hao J, Zhang B, Yang Y, Song W, Zhang Y, Yokoyama K & Wang L 2011. Pathogenic spectrum of fungal keratitis and specific identification of *Fusarium solani*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 2804-8.
- Hickey MJ & Kuberski P 2009. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol*, 9, 364-75.
- Homa M, Shobana CS, Singh YR, Manikandan P, Selvam KP, Kredics L, Narendran V, Vagvolgyi C & Galgoczy L 2013. *Fusarium* keratitis in South India: causative agents, their antifungal susceptibilities and a rapid identification method for the *Fusarium solani* species complex. *Mycoses*, 56, 501-11.
- Hou A, Tin MQ & Tong L 2017. Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B pathway activation in ocular surface epithelial cells. *Eye Vis (Lond)*, 4, 17.
- Hua X, Yuan X, Di Pietro A & Wilhelmus KR 2010. The molecular pathogenicity of *Fusarium* keratitis: a fungal transcriptional regulator promotes hyphal penetration of the cornea. *Cornea*, 29, 1440-4.
- Hume EBH, Flanagan J, Masoudi S, Zhu H, Cole N & Willcox MDP 2009. Soft Contact Lens Disinfection Solution Efficacy: Clinical *Fusarium* Isolates vs. ATCC 36031. *Optom Vis Sci* 86, 415–419.
- Iguban EB, Nañagas JPR & De Mesa-Rodriguez RF 2013. The Antimicrobial Efficacy of Multipurpose Contact Lens Solutions on Standard Strains of Common Ocular Pathogens *Philipp J Ophthalmol*, 38, 35-42.
- Imamura Y, Chandra J, Mukherjee PK, Lattif AA, Szczotka-Flynn LB, Pearlman E, Lass JH, O'donnell K & Ghannoum MA 2008. *Fusarium* and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 171-82.
- Jin X, Qin Q, Tu L, Zhou X, Lin Y & Qu J 2007. Toll-like receptors (TLRs) expression and function in response to inactivate hyphae of *Fusarium solani* in immortalized human corneal epithelial cells. *Mol Vis*, 13, 1953-61.
- Jin X, Zhao Y, Zhang F, Wan T, Fan F, Xie X & Lin Z 2016. Neutrophil extracellular traps involvement in corneal fungal infection. *Mol Vis*, 22, 944-52.
- Kahn CR, Young E, Lee IH & Rhim JS 1993. Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 3429-41.
- Kalkanci A & Ozdek S 2011. Ocular fungal infections. *Curr Eye Res*, 36, 179-89.
- Katiyar SK & Edlind TD 2009. Role for Fks1 in the intrinsic echinocandin resistance of *Fusarium solani* as evidenced by hybrid expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 1772-8.

- Keay L, Edwards K & Stapleton F 2008. Referral pathways and management of contact lens-related microbial keratitis in Australia and New Zealand. *Clin Exp Ophthalmol*, 36, 209-16.
- Lakhundi S, Siddiqui R & Khan NA 2017. Pathogenesis of microbial keratitis. *Microb Pathog*, 104, 97-109.
- Lam DS, Houang E, Fan DS, Lyon D, Seal D, Wong E & Hong Kong Microbial Keratitis Study G 2002. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. *Eye (Lond)*, 16, 608-18.
- Leal SM, Jr., Cowden S, Hsia YC, Ghannoum MA, Momany M & Pearlman E 2010. Distinct roles for Dectin-1 and TLR4 in the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* keratitis. *PLoS Pathog*, 6, e1000976.
- Leal SM, Jr., Vareechon C, Cowden S, Cobb BA, Latge JP, Momany M & Pearlman E 2012a. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *J Clin Invest*, 122, 2482-98.
- Leal SM & Pearlman E 2012b. The role of cytokines and pathogen recognition molecules in fungal keratitis – Insights from human disease and animal models. *Cytokine*, 58, 107-111.
- Liesegang TJ 2002. Physiologic Changes of the Cornea with Contact Lens Wear. *The CLAO Journal* 28, 12–27.
- Martin R, Moran GP, Jacobsen ID, Heyken A, Domey J, Sullivan DJ, Kurzai O & Hube B 2011. The *Candida albicans*-specific gene EED1 encodes a key regulator of hyphal extension. *PLoS One*, 6, e18394.
- Mehl HL & Epstein L 2008. Sewage and community shower drains are environmental reservoirs of *Fusarium solani* species complex group 1, a human and plant pathogen. *Environ Microbiol*, 10, 219-27.
- Meinhardt K 2011. Analyse der Reversion von filamentösem Wachstum zur Hefeform anhand der *Candida albicans* Mutante *tup1Δ*. *Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena*.
- Mukherjee PK, Chandra J, Yu C, Sun Y, Pearlman E & Ghannoum MA 2012. Characterization of fusarium keratitis outbreak isolates: contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 4450-7.
- Naiker S & Odhav B 2004. Mycotic keratitis: profile of *Fusarium* species and their mycotoxins. *Mycoses*, 47, 50-6.
- Nelson PE, Dignani MC & Anaissie EJ 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev*, 7, 479-504.
- O'donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJ, Lysoe E, Rehner SA, Aoki T, et al. 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet Biol*, 52, 20-31.
- O'donnell K, Sarver BA, Brandt M, Chang DC, Noble-Wang J, Park BJ, Sutton DA, Benjamin L, Lindsley M, Padhye A, et al. 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol*, 45, 2235-48.
- Ong HS, Fung SSM, Macleod D, Dart JKG, Tuft SJ & Burton MJ 2016. Altered Patterns of Fungal Keratitis at a London Ophthalmic Referral Hospital: An Eight-Year Retrospective Observational Study. *Am J Ophthalmol*, 168, 227-236.
- Pinnock A, Shivshetty N, Roy S, Rimmer S, Douglas I, Macneil S & Garg P 2017. Ex vivo rabbit and human corneas as models for bacterial and fungal keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 255, 333-342.
- Rachwalik D & Pleyer U 2015. Bacterial Keratitis. *Klin Monbl Augenheilkd*, 232, 738-44.
- Reichl S, Bednarz J & Muller-Goymann CC 2004. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol*, 88, 560-5.
- Roth M, Daas L, Renner-Wilde A, Cvetkova-Fischer N, Saeger M, Herwig-Carl M, Matthaei M, Fekete A, Kakkassery V, Walther G, et al. 2019. Das Deutsche Pilz-Keratitis-Register. *Der Ophthalmologe*, 116, 957–966.
- Santodomingo-Rubido J, Mori O & Kawaminami S 2006. Cytotoxicity and antimicrobial activity of six multipurpose soft contact lens disinfecting solutions. *Ophthalmic Physiol Opt*, 26, 476-82.
- Sav H, Rafati H, Oz Y, Dalyan-Cilo B, Ener B, Mohammadi F, Ilkit M, Van Diepeningen AD & Seyedmousavi S 2018. Biofilm Formation and Resistance to Fungicides in Clinically Relevant Members of the Fungal Genus *Fusarium*. *J Fungi*, 4.
- Segal AW 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23, 197-223.
- Shoff ME, Lucas AD, Brown JN, Hitchins VM & Eydelman MB 2012. The effects of contact lens materials on a multipurpose contact lens solution disinfection activity against *Staphylococcus aureus*. *Eye Contact Lens*, 38, 368-73.

- Short DP, O'donnell K, Thrane U, Nielsen KF, Zhang N, Juba JH & Geiser DM 2013. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genet Biol*, 53, 59-70.
- Siddiqui R, Lakhundi S & Khan NA 2015. Status of the effectiveness of contact lens solutions against keratitis-causing pathogens. *Cont Lens Anterior Eye*, 38, 34-8.
- Silva S, Henriques M, Hayes A, Oliveira R, Azeredo J & Williams DW 2011. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an in vitro oral epithelium. *J Oral Pathol Med*, 40, 421-7.
- Stapleton F, Keay L, Edwards K, Naduvilath T, Brian G & Jacobs R 2007. Studies of contact lens-related microbial keratitis in Australia and New Zealand: new learnings. *Eye Contact Lens*, 33, 354-7; discussion 362-3.
- Sun Y, Chandra J, Mukherjee P, Szczotka-Flynn L, Ghannoum MA & Pearlman E 2010. A murine model of contact lens-associated fusarium keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 1511-6.
- Tariq F & Koay P 2013. The Risk of Contact Lens Wear and the Avoidance of Complications *Int J Med Students* 1, 80-5.
- Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S & Wong SY 2002. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol*, 169, 3876-82.
- Taylor PR, Leal SM, Jr., Sun Y & Pearlman E 2014. Aspergillus and Fusarium corneal infections are regulated by Th17 cells and IL-17-producing neutrophils. *J Immunol*, 192, 3319-27.
- Thomas PA & Kaliyamurthy J 2013. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect*, 19, 210-220.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V & Zychlinsky A 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*, 8, 668-76.
- Van Diepeningen AD, Al-Hatmi AMS, Brankovics B & De Hoog GS 2014. Taxonomy and Clinical Spectra of *Fusarium* Species: Where Do We Stand in 2014? *Current Clinical Microbiology Reports*, 1, 10-18.
- Walther G, Al-Hatmi A, Kredics L, Homa M, Manikandan P, Oechsler RA, Hofling-Lima AL, De Hoog GS, Von Lilienfeld-Toal M & Kurzai O 2018. *Fusarium* keratitis: the species and their occurrence. *MEDICAL MYCOLOGY*, 56, 13.
- Walther G & Kurzai O 2015. Aspergillus & Fusarium. *Mikroskopierkurs des Nationalen Referenzzentrums für Invasive Pilzinfektionen Jena*.
- Walther G, Stasch S, Kaerger K, Hamprecht A, Roth M, Cornely OA, Geerling G, Mackenzie CR, Kurzai O & Von Lilienfeld-Toal M 2017. *Fusarium* Keratitis in Germany. *J Clin Microbiol*, 55, 2983-2995.
- Wu TG, Keasler VV, Mitchell BM & Wilhelmus KR 2004. Immunosuppression affects the severity of experimental *Fusarium solani* keratitis. *J Infect Dis*, 190, 192-8.
- Zhang J, Wu XY & Yu FS 2005. Inflammatory responses of corneal epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Curr Eye Res*, 30, 527-34.
- Zhang N, O'donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA & Geiser DM 2006a. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol*, 44, 2186-90.
- Zhang S, Ahearn DG, Noble-Wang JA, Stulting RD, Schwam BL, Simmons RB, Pierce GE & Crow SA, Jr. 2006b. Growth and Survival of *Fusarium solani*-*F. oxysporum* Complex on Stressed Multipurpose Contact Lens Care Solution Films on Plastic Surfaces In Situ and In Vitro. *Cornea*, 25, 1210 - 1216.

11 Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BPE	<i>bovine pituitary extract</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
CA	<i>California</i>
CL	<i>contact lens(es)</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP51A	<i>Cytochrome P450 Familie 51, Unterfamilie A</i>
dl	Deziliter
DMEM	<i>Delbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Delbeccos's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF 1-53	<i>human recombinat epithelial growth factor 1-53</i>
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
FaDu	Humane Pharynxkarzinomzellen vom Typ FaDu (ATCC® HTB-43™)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSSC	<i>Fusarium solani species complex</i>
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>

Anhang

HCE	<i>human corneal epithelial cells</i>
HCL	Salzsäure
IkBa	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha</i>
IL	Interleukin
KBE	Kolonien bildende Einheiten
KL	Kontaktlinse(n)
l	Liter
LC	<i>Low control</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
Maldi-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i>
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration (mg/l)
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPO	Myeloperoxidase
µl	Mikroliter
N	Normalität = Äquivalenzkonzentration
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
nm	Nanometer
NRZMyk	Nationales Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen
O ₂ ⁻	Superoxidanion
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PDA	<i>potato dextrose agar</i>
pg	Pikogramm
ReNu® ML	Bausch & Lomb ReNu® with MoistureLoc®

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RT	Raumtemperatur
Sab-Agar	Sabouraud-Dextrose-Agar
Sab-Bouillon	Sabouraud-Dextrose-Bouillon
Spp.	Spezies / species
Tab.	Tabelle
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptoren
U/min	Umdrehungen pro Minute
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YPD-Agar	<i>yeast extract peptone dextrose agar</i>

11.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete <i>Fusarium</i> - und <i>Candida</i> -Spp.....	15
Tab. 2	Kulturmedien für <i>Fusarium</i> spp. und <i>C. albicans</i> SC5314	16
Tab. 3	Verwendete Zellkulturmedien, Zusätze und Reagenzien für die Zellkultur.....	17
Tab. 4	Verwendete KL-Kombilösungen und deren Wirkstoffe.....	18
Tab. 5	Verwendete KL und deren Materialien	18
Tab. 6	Verwendete Reagenzien	19
Tab. 7	Verwendete technische Geräte	20
Tab. 8	Vergleich der DIN EN ISO 14729 gegenüber der FITC-Färbung von Konidien..	47

11.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Morphologie von <i>Fusarium</i>	6
Abb. 2	Unspezifische Immunreaktion ausgelöst durch <i>Fusarium</i> spp. am Auge	11
Abb. 3	Testschema der DIN EN ISO 14729 – „Stand Alone Tests“	26
Abb. 4	Funktionsprinzip des „Cytotoxicity Detektion Kit (LDH)“	28
Abb. 5	Einfluss der Kombilösungen und KL-Sorten auf die Keimrate der Konidien	32
Abb. 6	Auskeimung FITC gefärbter Konidien in Kombilösung A	34
Abb. 7	FITC gefärbte Konidien zum Zeitpunkt 0h und nach 47h in Kombilösung A	36
Abb. 8	Mittlere Reduktion der Keimfähigkeit von Konidien in % nach Inkubation in Kombilösungen A, B und C im Stand Alone Test nach der DIN EN ISO 14729 .	38
Abb. 9	KL nach Inkubation in Sab-Bouillon mit <i>Fusarium</i> -Isolaten und nach Spülung mit PBS	39
Abb. 10	KL nach Inkubation in Kombilösung A mit <i>Fusarium</i> -Isolaten	40
Abb. 11	KL nach Inkubation in Kombilösung A mit <i>Fusarium</i> -Isolaten und nach Spülung mit Kombilösung A	40
Abb. 12	Zytotoxizität in % der <i>Fusarium</i> -Isolate und <i>C. albicans</i> SC5314 gegenüber Pharynxkarzinomzellen	41
Abb. 13	Zytotoxizität in % der <i>Fusarium</i> -Isolate und <i>C. albicans</i> SC5314 gegenüber Korneaepithelzellen.....	42
Abb. 14	Zytokinausschüttung der Korneaepithelzellen nach <i>Fusarium</i> -Koinkubation	43

11.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Wirt – Pathogen Interaktion bei Hornhautinfektionen durch *Fusarium* spp.“ eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Host – Pathogen Interaction in Keratitis caused by *Fusarium* spp.” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

11.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Oliver Kurzai, Vorstand des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, möchte ich für die Möglichkeit der Bearbeitung des spannenden Themas, die hilfreichen Diskussionen, die konstruktive Kritik und die stetige Unterstützung bei der Projektplanung und -umsetzung danken.

Ganz im Besonderen gilt mein Dank Frau Dr. Sandra Scheufen. Ihre herausragende Betreuung hinsichtlich labortechnischer und wissenschaftlicher Fragen hat einen entscheidenden Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau Dr. Grit Walther vom NRZMyk am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut, möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung der verwendeten Pilzspezies, für die umfassende wissenschaftliche Unterstützung und die sehr hilfreiche Beratung hinsichtlich des Verfassens meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Frau Dr. Kerstin Hünninger aus der Arbeitsgruppe Fungal Septomics am Zentrum für Innovationskompetenz Septomics in Jena gilt mein Dank für die laboratorische Durchführung der IL-8 Messungen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Frosch und Herrn Prof. Dr. Jürgen Löffler, genauso wie bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Oliver Kurzai bedanken, dass sie mir als Teil des Promotionskomitees im Rahmen der Promotion bei der Graduate School of Life Sciences der Universität Würzburg mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenso danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Oliver Kurzai für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, die vielen guten Ideen und für ein immer offenes Ohr. Besonderer Dank gilt dabei Frau Sabrina Speiser.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern Ingeborg und Manfred Koch, die während meines gesamten Studiums für mich da waren und mich unterstützt haben und meiner Ehefrau Hanna Koch, die stets eine gute ZuhörerIn gewesen ist, mich motiviert und diese Arbeit mit vielen guten Ratschlägen bereichert hat.

11.6 Lebenslauf