

# Contactlens gerelateerde Acanthamoeba keratitis.

22/05/2014

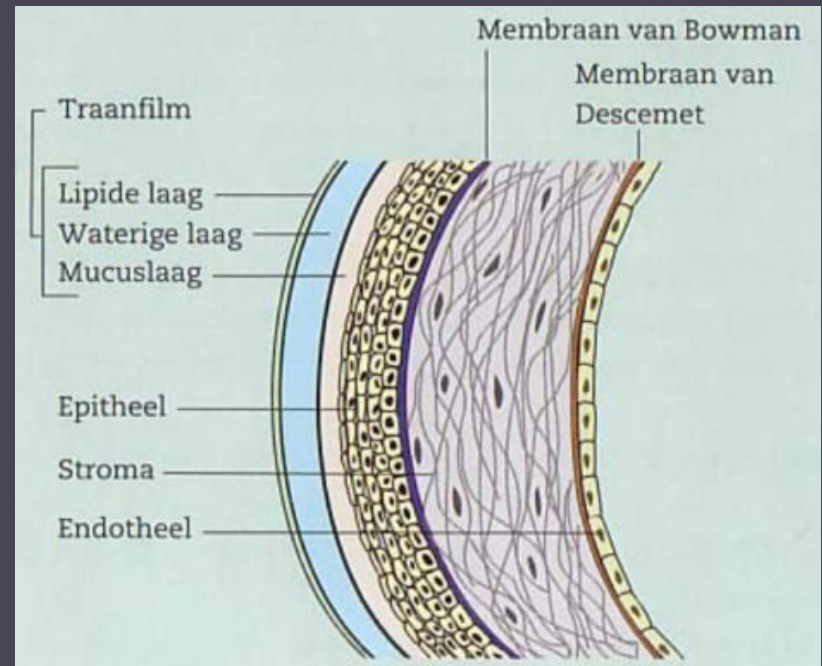
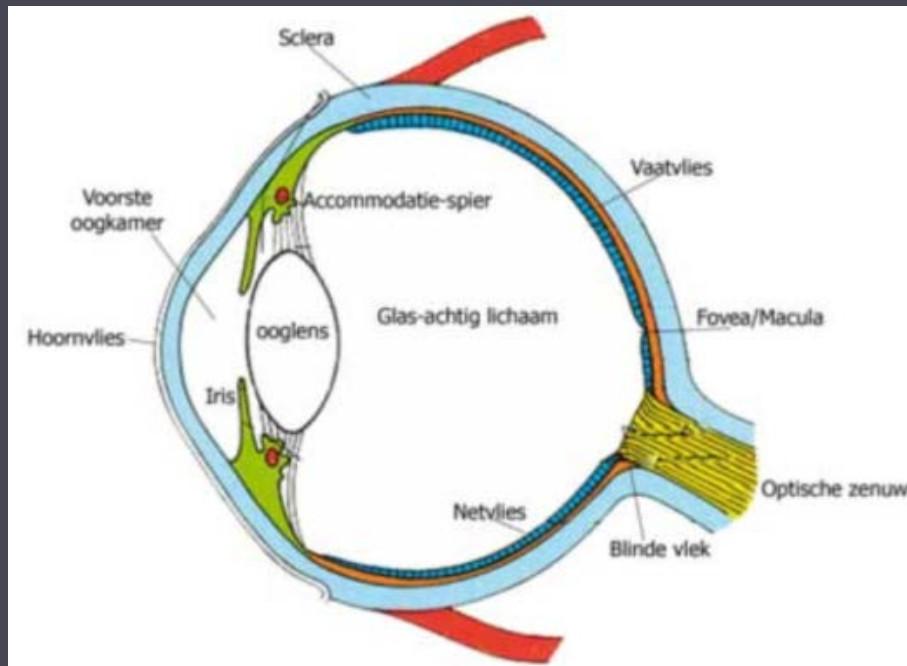
Apr. Jolien Claessens

Supervisor: Prof. Dr. Katrien Lagrou

# Inleiding

- De cornea
- Microbiële keratitis
- Contactlens gerelateerde Acanthamoeba keratitis

# De cornea



# Microbiële keratitis



- Ontsteking van de cornea
- Symptomen:
  - Pijn, rood, traanproductie, fotofobie, vermindering gezichtsvermogen.
- Risicofactoren:
  - Beschadigingen cornea, chronische ziekten oogoppervlak, systemische ziekten en contactlenzen.
- Oorzakelijke agentia:
  - Bacteriën, virussen, fungi en amoeben.

# Incidentie



- Contactlens gerelateerde microbiële keratitis:

Jaarlijkse incidentie per 10.000 contactlensdragers

	Harde gaspermeabele lenzen (Daily wear)	Zachte contactlenzen (Daily wear)	Zachte contactlenzen (Extende wear)
Nederland (1996) <i>Cheng et al. 1999</i>	1,1 (C.I.: 0,6-1,7)	3,5 (C.I.: 2,7-4,5)	20,0 (C.I.: 10,3-35,0)
Zweden (1993) <i>Nilsson et al. 1994</i>	1,2 (C.I.: 1,1-1,5)	1,9 (C.I.: 1,8-2,0)	19,5 (C.I.: 14,6-29,5)
Australië (2003-2004) <i>Stapleton et al. 2008</i>	0,44 (C.I.: -)	3,09 (C.I.: -)	9,3 (C.I.: -)
Hong Kong (1997-1998) <i>Lam et al. 2002</i>	1,48 (C.I.: -)	2,17 (C.I.: -)	13,33 (C.I.: -)
Gemiddelde	1,05	2,67	15,5

"Extended wear" : overnacht en continu dragen gedurende 7-30 dagen.

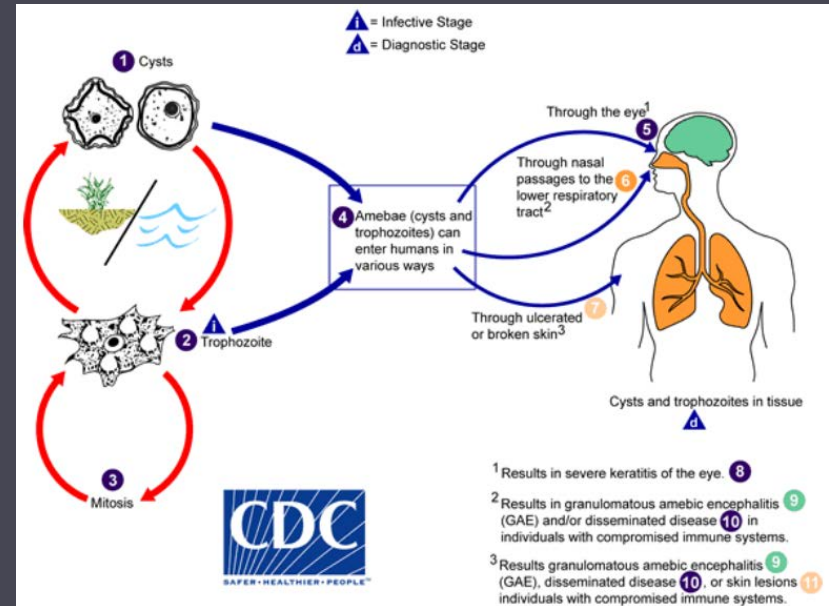
# Risicofactoren

- Contactlens gerelateerde microbiële keratitis:

Risk Factor	Relative Risk (RR)	95% CI	P Value
Wear schedule			
DW only	1.00 (referent)		
Occasional ON	1.87	1.42–2.46	<0.001
ON	5.28	3.26–8.56	<0.001
Days of CL wear per week			
≤2	1.00 (referent)		
3–5	3.46	1.82–6.56	<0.001
6–7	6.05	3.34–10.96	<0.001
Hand washing before cleaning			
Always	1.00 (referent)		
Not always	1.49	1.13–1.97	0.005

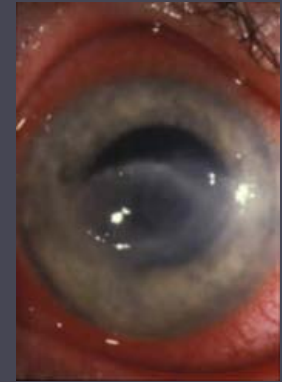
# Acanthamoeba

- Eencellig, amoebe
- Oppervlaktewateren, zwembaden, kraantjeswater...
- Cysten en trofozoïeten
- Genotypes (T<sub>1</sub>-T<sub>17</sub>):
  - T<sub>4</sub> is frequents geassocieerd met pathologie.



# CL *Acanthamoeba* keratitis

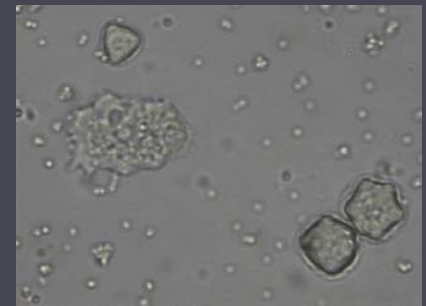
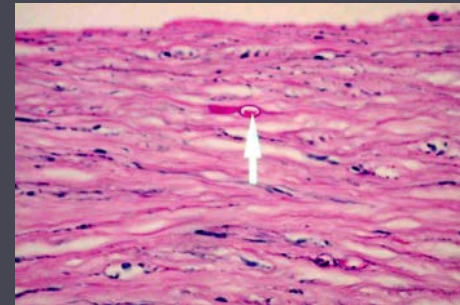
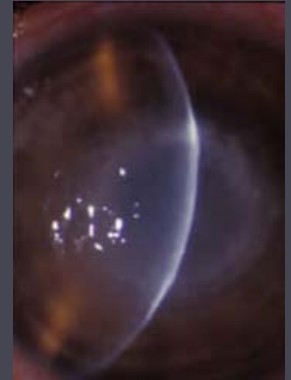
- Symptomen:  
= microbiële keratitis + ringinfiltraat
- Incidentie :  
1,93 per 100.000 contactlensdragers
- Risicofactoren:  
Contactlenzen
  - 93% van AK patiënten gebruikte contactlenzen
  - Gebrekkige hygiëne contactlensdoosje
  - Zwemmen met contactlenzen





# Diagnose AK

- Klinisch vermoeden:
  - Contactlenzen
  - Ringinfiltraat
  - Falen antibacteriële of antivirale therapie
- Rechtstreeks microscopisch onderzoek:
- Cultuur :
  - Nutriëntarme voedingsbodem met *E. coli*
  - Incubatie: max. 5 dagen bij 30°C



# Prognose AK

Claerhout *et al.* 2004

- Verband tijdstip tot diagnose en prognose
- Laattijdige diagnose (> 18 dagen)



Case	Misdiagnosis	Delay in therapy (days)	BCVA after medical treatment
<b>Group I</b>			
1	Bacterial ulcer	5	20/20
2	Bacterial ulcer	7	HM
3	–	3	20/20
4	Bacterial ulcer	4	20/20
5	Keratoconjunctivitis	15	20/20
6	Keratoconjunctivitis	17	20/20
<b>Group II</b>			
7	Keratoconjunctivitis	27 (1 month)	20/200
8	Conjunctivitis	30 (1 month)	20/40
9	HSV	34 (1 month)	HM
10	HSV	199 (6.5 months)	CF
11	Bacterial ulcer	25 (1 month)	20/60
12	Fungal keratitis	28 (1 month)	HM
13	Bacterial ulcer	49 (1.5 months)	20/20
14	HSV	32 (1 month)	HM

→ Blijvende vermindering van het zicht

CF: counting fingers

HM: hand movements



# Behandeling AK

- Oogdruppels iedere 30'-1u.
  - Propamidine + polyhexamethylene biguanide.
  - Combineren met antifungale of antibacteriële middelen.
- Corneatransplantatie



**Snelle en gevoelige diagnostische test  
gewenst.**

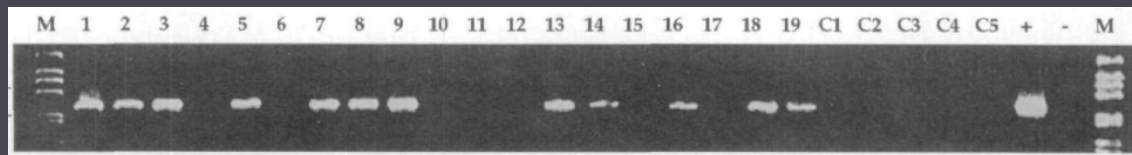
# Vragen

- 1) Biedt moleculaire diagnostiek een meerwaarde?
- 2) Is er toepassingsmogelijkheid in UZ Leuven?

# Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

*Yera et al. 2006*

- Vergelijking microscopie/cultuur met PCR:
  - Nelson PCR methode



- Analyse van 513 stalen → 16 positief :
  - Microscopie + cultuur + 6/16
  - Nelson-PCR + 12/16

# Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

Yera *et al.* 2006

Gevoeligheid cultuur 50%-75%  
(Bacon *et al.* 1993)

Patient number	Corneal sample code <sup>a</sup>	Time period <sup>b</sup> (weeks)	Prior treatment <sup>c</sup>	ME	Culture	PCR <sup>d</sup>			Genotype <sup>e</sup>
						Nelson	ACARNA	JDP	
AK <sup>f</sup>									
1	29AND	3	V	-	+	-	+	+	T4
2	33SIS	9	V	-	-	+	+	+	T4
	68SIS	19	-	+	-	+	+	+	
3	93GUIL <sup>g</sup>	8	B+V	+	-	+	+	+	T11
	143GUIL	20	-	-	-	+	+	+	
	308GUIL	41	-	ND <sup>h</sup>	ND <sup>h</sup>	+	+	+	
4	115GER	4	B+V	-	-	+	+	-	ND
5	116MAF	4	B+V	-	-	+	+	+	T4
6	155BAL	12	B+V	+	-	-	-	-	-
	222BAL	20	-	+	-	+	+	+	T4
7	250GILLE	3	B	-	-	+	+	+	T2-T6
8	343TRE	13	B+V	-	-	+	+	+	T4
9	401SOD	20	B+V	-	-	+	-	-	ND
10	413GAB	4	B	+	-	+	+	+	T4+T4
11	457ZAH	2	K	-	-	-	-	+	T3
12	476DAC	4	B+V	-	-	+	+	+	T4

# Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

Yera *et al.* 2006

T<sub>4</sub> genotype was meest frequent

Patient number	Corneal sample code <sup>a</sup>	Time period <sup>b</sup> (weeks)	Prior treatment <sup>c</sup>	ME	Culture	PCR <sup>d</sup>			Genotype <sup>e</sup>
						Nelson	ACARNA	JDP	
AK <sup>f</sup>									
1	29AND	3	V	-	+	-	+	+	T4
2	33SIS	9	V	-	-	+	+	+	T4
	68SIS	19	-	+	-	+	+	+	
3	93GUIL <sup>g</sup>	8	B+V	+	-	+	+	+	T11
	143GUIL	20	-	-	-	+	+	+	
	308GUIL	41	-	ND <sup>h</sup>	ND <sup>h</sup>	+	+	+	
4	115GER	4	B+V	-	-	+	+	-	ND
5	116MAF	4	B+V	-	-	+	+	+	T4
6	155BAL	12	B+V	+	-	-	-	-	-
	222BAL	20	-	+	-	+	+	+	T4
7	250GILLE	3	B	-	-	+	+	+	T2-T6
8	343TRE	13	B+V	-	-	+	+	+	T4
9	401SOD	20	B+V	-	-	+	-	-	ND
10	413GAB	4	B	+	-	+	+	+	T4+T4
11	457ZAH	2	K	-	-	-	-	+	T3
12	476DAC	4	B+V	-	-	+	+	+	T4

# Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

Yera *et al.* 2006

Patiënten werden reeds behandeld  
→ Initieel verkeerde diagnose

Patient number	Corneal sample code <sup>a</sup>	Time period <sup>b</sup> (weeks)	Prior treatment <sup>c</sup>	ME	Culture	PCR <sup>d</sup>			Genotype <sup>e</sup>
						Nelson	ACARNA	JDP	
AK <sup>f</sup>									
1	29AND	3	V	-	+	-	+	+	T4
2	33SIS	9	V	-	-	+	+	+	T4
	68SIS	19	-	+	-	+	+	+	
3	93GUIL <sup>g</sup>	8	B+V	+	-	+	+	+	T11
	143GUIL	20	-	-	-	+	+	+	
	308GUIL	41	-	ND <sup>h</sup>	ND <sup>h</sup>	+	+	+	
4	115GER	4	B+V	-	-	+	+	-	ND
5	116MAF	4	B+V	-	-	+	+	+	T4
6	155BAL	12	B+V	+	-	-	-	-	-
	222BAL	20	-	+	-	+	+	+	T4
7	250GILLE	3	B	-	-	+	+	+	T2-T6
8	343TRE	13	B+V	-	-	+	+	+	T4
9	401SOD	20	B+V	-	-	+	-	-	ND
10	413GAB	4	B	+	-	+	+	+	T4+T4
11	457ZAH	2	K	-	-	-	-	+	T3
12	476DAC	4	B+V	-	-	+	+	+	T4



# Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

Yera *et al.* 2006

Uiteenlopende momenten van  
staalname

Patient number	Corneal sample code <sup>a</sup>	Time period <sup>b</sup> (weeks)	Prior treatment <sup>c</sup>	ME	Culture	PCR <sup>d</sup>			Genotype <sup>e</sup>
						Nelson	ACARNA	JDP	
AK <sup>f</sup>									
1	29AND	3	V	-	+	-	+	+	T4
2	33SIS	9	V	-	-	+	+	+	T4
	68SIS	19	-	+	-	+	+	+	
3	93GUIL <sup>g</sup>	8	B+V	+	-	+	+	+	T11
	143GUIL	20	-	-	-	+	+	+	
	308GUIL	41	-	ND <sup>h</sup>	ND <sup>h</sup>	+	+	+	
4	115GER	4	B+V	-	-	+	+	-	ND
5	116MAF	4	B+V	-	-	+	+	+	T4
6	155BAL	12	B+V	+	-	-	-	-	-
	222BAL	20	-	+	-	+	+	+	T4
7	250GILLE	3	B	-	-	+	+	+	T2-T6
8	343TRE	13	B+V	-	-	+	+	+	T4
9	401SOD	20	B+V	-	-	+	-	-	ND
10	413GAB	4	B	+	-	+	+	+	T4+T4
11	457ZAH	2	K	-	-	-	-	+	T3
12	476DAC	4	B+V	-	-	+	+	+	T4

# Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

Yera *et al.* 2006

Staalname op later tijdstip geeft  
grotere kans op + microscopie/cultuur

Patient number	Corneal sample code <sup>a</sup>	Time period <sup>b</sup> (weeks)	Prior treatment <sup>c</sup>	ME	Culture	PCR <sup>d</sup>			Genotype <sup>e</sup>
						Nelson	ACARNA	JDP	
AK <sup>f</sup>									
1	29AND	3	V	-	+	-	+	+	T4
2	33SIS	9	V	-	-	+	+	+	T4
	68SIS	19	-	+	-	+	+	+	
3	93GUIL <sup>g</sup>	8	B+V	+	-	+	+	+	T11
	143GUIL	20	-	-	-	+	+	+	
	308GUIL	41	-	ND <sup>h</sup>	ND <sup>h</sup>	+	+	+	
4	115GER	4	B+V	-	-	+	+	-	ND
5	116MAF	4	B+V	-	-	+	+	+	T4
6	155BAL	12	B+V	+	-	-	-	-	-
	222BAL	20	-	+	-	+	+	+	T4
7	250GILLE	3	B	-	-	+	+	+	T2-T6
8	343TRE	13	B+V	-	-	+	+	+	T4
9	401SOD	20	B+V	-	-	+	-	-	ND
10	413GAB	4	B	+	-	+	+	+	T4+T4
11	457ZAH	2	K	-	-	-	-	+	T3
12	476DAC	4	B+V	-	-	+	+	+	T4

# Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

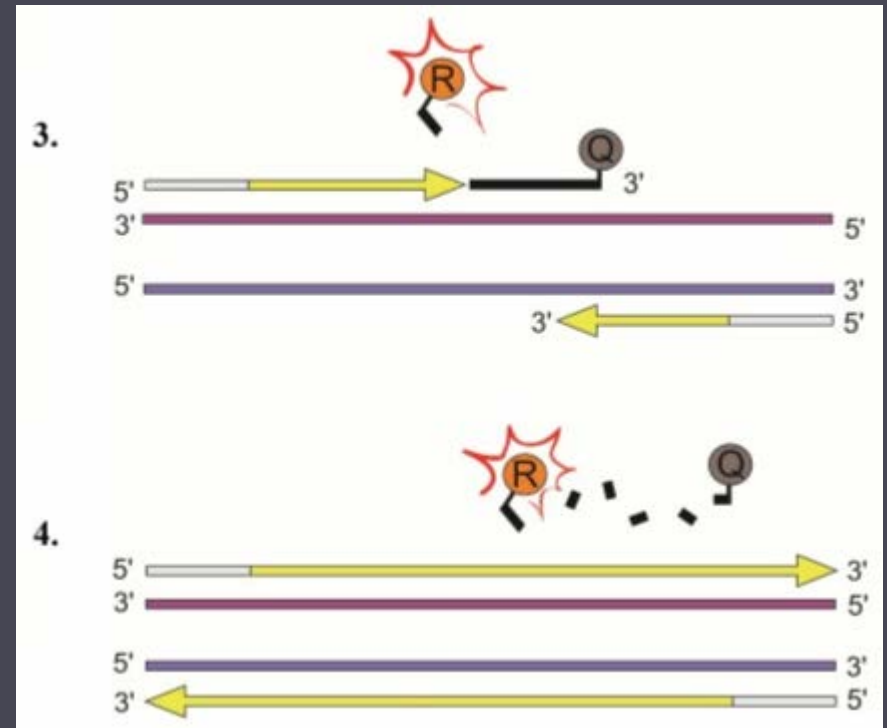
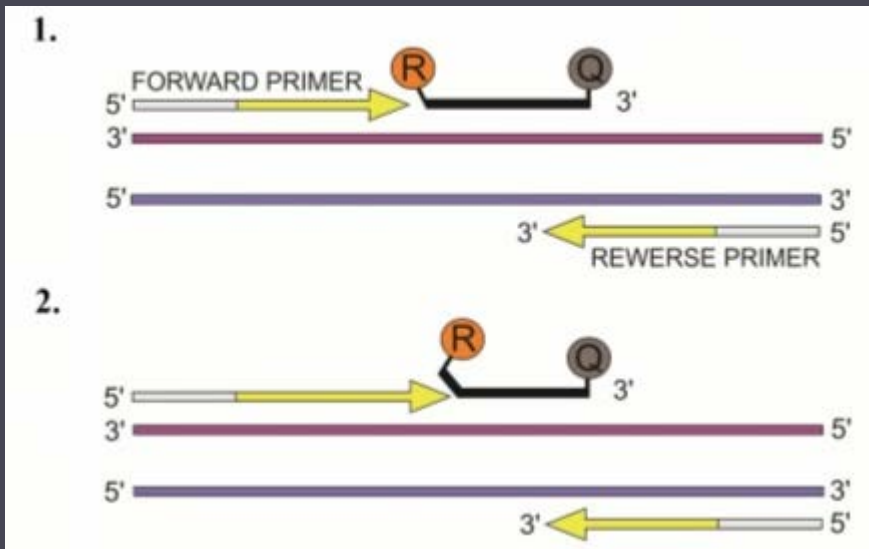
**➔ PCR is gevoeliger dan microscopie/cultuur:**

- Vanaf vroege fase van de infectie
- Cave misdiagnose

**En real-time qPCR?**

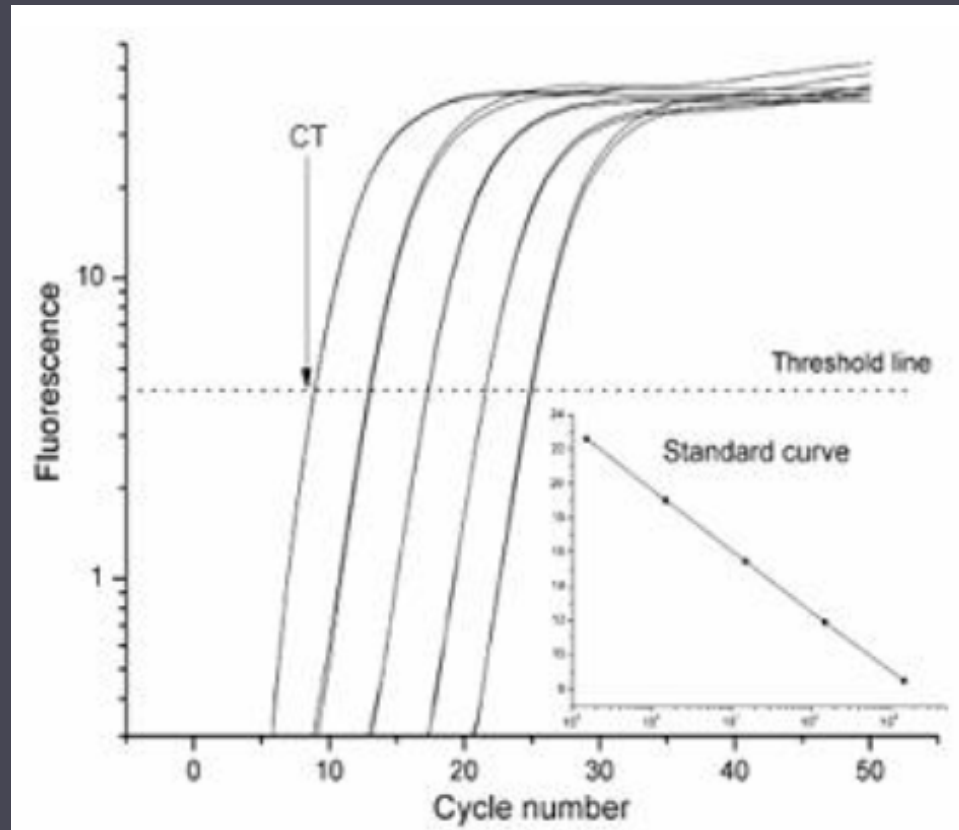
# Real-Time qPCR

- Detectie gebeurt tijdens amplificatie-reactie



# Real-Time qPCR

- Detectie gebeurt tijdens amplificatie-reactie



# Real-Time qPCR in de diagnose van AK

**Maubon *et al.* 2012**

- Real-Time qPCR assay voor detectie *Acanthamoeba*
- 21 stalen van vermoedelijke AK
  - Rechtstreeks microscopisch onderzoek: 0
  - Cultuur: 0
  - qPCR: 3

**En real-time qPCR?**

Betere gevoeligheid qPCR, maar kleine studie

# Real-Time qPCR in de diagnose van AK

## Khairnar *et al.* 2011

- 128 stalen, vermoedelijke AK
- 2 gel-based methodes, 2 qPCR methodes
- Microscopie/cultuur als referentiemethode

Assay type	Microscopy and/or culture	
	Sensitivity <sup>a</sup>	Specificity <sup>b</sup>
Nelson-PCR	50% (95% CI, 32.63–67.37)	99% (95% CI, 94.55–99.82)
JDP-PCR	53.6% (95% CI, 35.81–70.47)	98% (95% CI, 93–99.45)
Qvamstrom-QPCR	82.1% (95% CI, 64.41–92.12)	98% (95% CI, 93–99.45)
Riviere-QPCR	89.3% (95% CI, 72.80–96.29)	89% (95% CI, 81.37–93.75)
Microscopy and/or culture	NA <sup>c</sup>	NA

# Real-Time qPCR in de diagnose van AK

## Khairnar *et al.* 2011

- 2 gel-based methodes, 2 qPCR methodes
- Microscopie/cultuur als referentiemethode

Assay type	Microscopy and/or culture	
	Sensitivity <sup>a</sup>	Specificity <sup>b</sup>
Nelson-PCR	50% (95% CI, 32.63–67.37)	99% (95% CI, 94.55–99.82)
JDP-PCR	53.6% (95% CI, 35.81–70.47)	98% (95% CI, 93–99.45)
Qvamstrom-QPCR	82.1% (95% CI, 64.41–92.12)	98% (95% CI, 93–99.45)
Riviere-QPCR	89.3% (95% CI, 72.80–96.29)	89% (95% CI, 81.37–93.75)
Microscopy and/or culture	NA <sup>c</sup>	NA

- 11 stalen + met Rivière qPCR maar – met ref. methode



# Real-Time qPCR in de diagnose van AK

Khairnar *et al.* 2011

- Invloed van staaltype op het resultaat

Clinical specimen type	Positive by microscopy and/or culture	Positive by Riviere-QPCR	Positive by Qvamstrom-QPCR
Contact lens solution ( <i>n</i> = 5)	4	4	4
Contact lens ( <i>n</i> = 14)	5	4	4
Corneal scraping ( <i>n</i> = 66)	19	23	17
Eye scraping ( <i>n</i> = 3)	0	0	0
Eye swab ( <i>n</i> = 8)	0	1	0
Corneal ulcer swab ( <i>n</i> = 3)	0	0	0
Vitreous fluid ( <i>n</i> = 1)	0	0	0
Tap water ( <i>n</i> = 1)	0	0	0
Corneal biopsy ( <i>n</i> = 1)	0	0	0
Tissue biopsy eye ( <i>n</i> = 1)	0	1	0
Corneal swab ( <i>n</i> = 23)	0	3	0

17/19 +  
6 – via  
microsc./cult.

15/19 +  
2 – via  
microsc./cult.

Zijn deze werkelijk vals positief?

# Real-Time qPCR in de diagnose van AK

## Thompson *et al.* 2008

- 168 stalen, vermoedelijke AK
- 2 qPCR methodes met cultuur als referentiemethode
- 7 stalen + via cultuur ↔ 11 stalen + via qPCR

Rivière real-time PCR result	Qvarnstrom real-time PCR result (no. of isolates)				
	Positive	Negative	Indeterminate	Inhibitory	Total
Positive	11	2	0	0	13
Negative	0	149	0	0	149
Indeterminate	0	3	1	0	4
Inhibitory	0	0	0	2	2
Total	11	154	1	2	168

# Real-Time qPCR in de diagnose van AK

Thompson *et al.* 2008

- Inhibitie van PCR amplificatie door medicatie?

Drug	Minimal inhibitory dilution	AE
Proparacaine (anesthetic)	1/1	100.1
Prednisolone (steroid)	1/1	91.2
Br		
Ne		
Ge		
M		
To		
Cefazolin (antibiotic)	1/10	91.6
Amphotericin B (antifungal)	1/1	108.7
Trifluridine (antiviral)	1/40 <sup>a</sup>	94.6
Propamidine (antiacanthamoebic)	1/10	85.7
Polyhexamethylene biguanide (antiacanthamoebic)	1/640 <sup>b</sup>	72.7
Chlorhexidine (antiacanthamoebic)	1/10	77.0
Corneal tissue	1/1	86.9

Effect verdwijnt na DNA extractie

**Staal nemen alvorens te behandelen.**

extractie

# Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

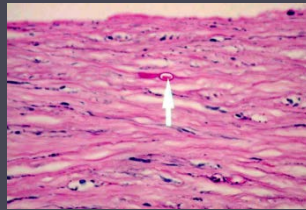
- PCR betere gevoeligheid dan microscopie/cultuur?
  - JA:
    - Yera *et al.* (2006) gel-based methode
    - Maubon *et al.* (2006) qPCR, kleine studie
  - ONDUIDELIJK:
    - Khairnar *et al.* (2011) sens. qPCR > gel-based
    - Thompson *et al.* (2008) staalname voor behandeling
- Advies: qPCR of PCR als bijkomende methode in diagnose AK.

# Toepasbaarheid in UZ Leuven?

- Overzicht aanvragen Acanthamoeba cultuur 2013:
  - Antwoordtijd pos. cultuur: 3 dagen  
PCR biedt geen verkorting van antwoordtijd
  - Aantal aanvragen: 3/maand  
Te weinig aanvragen om stalen te groeperen
- qPCR opnemen als bijkomende methode?
  - Voldoende staal af te nemen voor microscopie, cultuur en qPCR?

# Toepasbaarheid in UZ Leuven?

- Methode: microscopie en cultuur



- Overzicht 2013:

2 pos. microscopie

5 pos. cultuur

- Microscopie herkent ook andere oorzaken van keratitis, vb.: fungi.



# Besluit

- 1) Biedt moleculaire diagnostiek een meerwaarde?
  - Niet w.b. antwoordtijd
  - Verbeterde gevoeligheid t.o.v. microscopie/cultuur (?)
  
- 2) Is er toepassingsmogelijkheid in UZ Leuven?
  - Weinig aanvragen
  - Verbeterde gevoeligheid (?)
  - Hoeveelheid staal beschikbaar?

# To Do

- 1) De vraag naar moleculaire technieken vanuit andere instellingen pijlen.
- 2) Design van real-time qPCR assay, selectie van primer-probe combinaties en voorkeur staaltype.





Vragen?