

CAT
Critically Appraised Topic

Titel: Waarde van PCR voor de diagnose van contactlens gerelateerde keratitis veroorzaakt door *Acanthamoeba*.

Author: Jolien Claessens

Supervisor: Prof. Dr. Katrien Lagrou

Search/methodology verified by:

Date: 22-05-2014

CLINICAL BOTTOM LINE

Keratitis is een pijnlijke en mogelijks zichtbedreigende infectie van de cornea, veroorzaakt door bacteriën, fungi, virussen of amoeben. Het dragen van contactlenzen vormt een risicofactor voor de ontwikkeling van keratitis, vermoedelijk door de interferentie met de zuurstofvoorziening van de cornea. De incidentie van contactlens gerelateerde microbiële keratitis varieert tussen 0,5 en 20 per 10.000 contactlensdragers per jaar, afhankelijk van het type contactlens en de duur van dragen. *Acanthamoeba* keratitis (AK) heeft een jaarlijkse incidentie van 0,2 per 10.000 contactlensdragers. Opmerkelijk is dat 95% van de patiënten met AK contactlenzen gebruikte. Bij contactlens gerelateerde AK worden gebrekkige hygiëne of zwemmen met de lenzen in als risicofactoren beschreven. De klinische presentatie van AK verschilt weinig van een bacteriële of virale keratitis en daarom wordt het vaak laatstijdig, meestal pas bij therapiefalen vastgesteld. Aangezien er een verband bestaat tussen het effect op het gezichtsvermogen en de tijd tussen de aanvang van de infectie en de start van de behandeling, is een snelle en precieze diagnostische test gewenst. De routine diagnose in UZ Leuven bestaat uit een combinatie van rechtstreeks microscopisch onderzoek van een corneaschraapsel en de cultuur van *Acanthamoeba* uit het corneaschraapsel, de contactlens of de contactlensvloeistof. Het gepresenteerde literatuuronderzoek gaat na of het nuttig is om een moleculaire techniek toe te voegen aan het diagnostische proces. Er werden twee qPCR analyses geëvalueerd maar er kon geen duidelijk besluit gevormd worden over een al dan niet verbeterde gevoeligheid van de moleculaire technieken ten opzichte van microscopie en cultuur. Om de toepasbaarheid van de moleculaire methodes in UZ Leuven na te gaan, werd opgezocht hoeveel analyses er gedurende het afgelopen jaar werden uitgevoerd. Dit toonde dat er gemiddeld drie aanvragen voor *Acanthamoeba* cultuur gebeuren per maand. Het lage aantal maakt groeperen van

stalen onmogelijk. Bovendien bedraagt de antwoordtijd bij een positieve cultuur gemiddeld drie dagen, waardoor de verkorting van de antwoordtijd minimaal zal zijn bij een moleculaire methode.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

I De cornea

De cornea is de meest oppervlakkige beschermlaag van het oog (Fig. 1a), het is een heldere structuur van ongeveer 0.5 mm dik. Samen met de lens is de cornea verantwoordelijk voor de projectie van een scherp beeld op het netvlies. De cornea is opgebouwd uit epitheelcellen en een laag endotheelcellen met tussenin de stroma (Fig. 1b). Aan de overgang met het epitheel is de stroma afgelijnd door het Bowman membraan en ter hoogte van het endotheel wordt die begrensd door het Descemet membraan. Deze membranen bieden steun voor respectievelijk het epitheel en het endotheel. De stroma en het epitheel zijn sterk bezenuwd waardoor de cornea uiterst gevoelig is. Deze gevoeligheid is van belang voor de knipperreflex. Prikkeling van de zenuwen door een vuiltje of uitdroging, zal de knipperreflex stimuleren waardoor het vuiltje wordt weggespoeld of de cornea bevochtigd wordt.

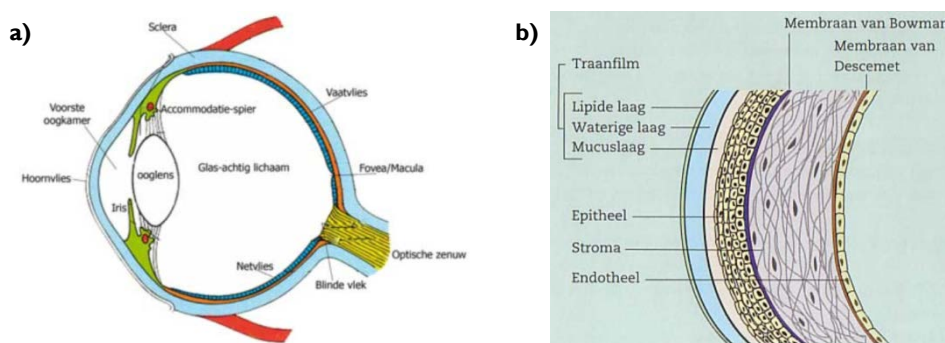


Fig. 1: (a) Anatomie van het oog. (b) Gedetailleerde opbouw van de cornea.

(Bron: www.debelgischeoptiekgids.be; op 03/05/2014)

Om de helderheid van de cornea te bewaren, zijn er geen bloedvaten aanwezig. Dit heeft tot gevolg dat de cellen waaruit de cornea opgebouwd is afhankelijk zijn van de externe aanvoer van voedingsstoffen en zuurstof. Ter hoogte van het epitheel wordt deze functie verzorgd door de traanfilm, die instaat voor de continue bevochtiging van de cornea en de bescherming tegen infecties. De buitenste laag van de traanfilm bestaat uit lipiden die geproduceerd worden door kliertjes in de oogleden en voorkomt het snel verdampen van de traan. De middelste waterige laag wordt geproduceerd in de traanklier. Deze laag bevat water, elektrolyten, mucines, proteïnen en anti-inflammatoire componenten. Het voorziet de cornea van zuurstof en voedingsstoffen, verzorgt een antimicrobiële functie en maakt het oogoppervlak glad zodat de lichtbreking optimaal is. De binnenste laag van de traanfilm is een mucuslaag die ervoor zorgt dat de traan zich gelijkmatig kan verspreiden over het oppervlak van de cornea.

(Bron: www.oogartsen.nl, www.debelgischeoptiekgids.be; laatst geconsulteerd op 3/05/2014)

2 Microbiële keratitis: incidentie en risicofactoren

Keratitis is een ontsteking van de cornea, die gekenmerkt wordt door pijn, roodheid van het oog, fotofobie, verhoogde tranenproductie en een gedaald gezichtsvermogen. Bovendien kan keratitis leiden tot een blijvende vermindering van het zicht ten gevolge van littekenvorming. (Bron: www.oogartsen.nl; laatst geconsulteerd op 3/05/2014)

Risicofactoren die geassocieerd zijn met keratitis zijn: beschadigingen aan het oog, chronische ziekten van het oogoppervlak (vb. atopische keratoconjunctivitis en blefaritis), systemische ziekten (vb. diabetes, reumatoïde artritis) en het dragen van contactlenzen. (Thomas *et al.* 2007) Contactlenzen maken de cornea meer vatbaar voor infecties door interferentie met de zuurstofvoorziening, de vernieuwing van het cornea epitheel, en de integriteit van de traanfilm. (Cavanagh *et al.* 2003, Dart *et al.* 2008)

De risicofactoren en klinische outcome van microbiële keratitis werden bestudeerd door **Keay et al. (2006)** in het Royal Victorian Eye and Ear Hospital in Australië, aan de hand van een retrospectieve studie tussen 2001 en 2003. Patiënten tussen 15 en 64 jaar waarbij de diagnose van microbiële keratitis werd gesteld of die behandeld werden voor microbiële keratitis, werden geïncludeerd. Er werden 291 patiënten opgenomen in de bestudeerde groep. De patiënten werden gegroepeerd al naargelang voorbeschikkende factoren. Tabel I toont dat ongeveer 1/3^e van de patiënten een beschadiging had aan het oog en dat 1/3^e van de patiënten contactlenzen gebruikte. Keratitis als gevolg van trauma kwam het frequentst voor bij mannen, bij de andere predisponerende factoren was de verdeling tussen mannen en vrouwen gelijk. De gemiddelde leeftijd van de patiënten met keratitis was lager bij contactlensdragers dan in de andere groepen.

Tabel I: Demografische gegevens en klinische ernst van de microbiële keratitis bij patiënten in Australië tussen 15 en 64 jaar. (Keay et al. 2006)

Cause	n	Gender [M:F (% Male)]	Age (Mean ± SD)	Central or Spanning >1 Quadrant (%)	Hypopyon or KP (%)	Lesion >2 mm (%)
Trauma	106	96:10 (90.6)	40±12	23/99 (23.3)	19/101 (18.8)	16/79 (20.3)
Contact lens	98	43:55 (43.9)	33±11	23/88 (28.4)	13/93 (14.0)	9/80 (11.3)
Other and unknown	28	14:14 (50.0)	42±13	9/28 (32.2)	5/21 (23.8)	11/23 (47.8)
OSD and systemic	21	12:9 (57.1)	47±12	5/20 (25.0)	5/19 (26.3)	7/19 (36.8)
Herpetic	20	10:10 (50.0)	43±10	6/19 (31.6)	3/19 (15.8)	7/14 (50.0)
Multifactorial	18	10:8 (55.6)	43±14	5/18 (27.8)	4/18 (22.2)	3/14 (21.4)
P value*		<0.001	<0.001	0.9	0.8	0.001

F = female; KP = keratic precipitates; M = male; OSD = ocular surface disease; SD = standard deviation.
*Chi-square test.

De studie van Keay *et al.* (2006) evalueerde het gezichtsvermogen na de behandeling, aan de hand van de Snellen letterkaart. Hierbij moet de patiënt van op 6 m afstand een reeks letters lezen van een welbepaalde grootte. Bij 23,3% van de patiënten werd een matige vermindering van het zicht waargenomen. Dit wil zeggen dat het verschil tussen de lijnen die gelezen konden worden met het aangetaste oog, 2 of meer lijnen verschilde van die die met het onaangetaste oog gelezen konden worden. Een ernstige vermindering van het zicht waarbij het verschil tussen beide ogen 10 of meer lijnen bedroeg werd waargenomen bij 1,6% van de totale studiepopulatie. (Keay *et al.* 2006)

Microbiële keratitis komt dus vaak voor bij contactlens dragers en heeft een impact op het zicht. Risicofactoren die de ontwikkeling van microbiële keratitis bij dragers van contactlenzen in de hand werken, werden geëvalueerd in een prospectieve studie uitgevoerd door **Dart et al. (2008)**, in het Moorfields Eye Hospital in het Verenigd Koninkrijk. Zij toonden een verband aan tussen het risico op microbiële keratitis en het type contactlens, de hygiëne, de duur, en de frequentie van dragen. Zij rapporteerden een significant hoger relatief risico (RR) van 5,28 (C.I.: 3,26-8,56) voor overnacht dragen van de contactlenzen in vergelijking met enkel overdag dragen. Bij frequenter dragen van de contactlenzen werd ook een toename van het risico op contactlens gerelateerde microbiële keratitis waargenomen en dat werd vertaald in een RR van 3,46 (C.I.: 1,82-6,56) voor het dragen van contactlenzen gedurende 3-5 dagen/week in vergelijking met ≤ 2 dagen/week, en een RR van 6,05 (C.I.: 3,34-10,96) voor het dragen van contactlenzen gedurende 6-7 dagen/week. Bovendien werd aangetoond dat het risico op microbiële keratitis toeneemt wanneer de contactlenzen gemanipuleerd werden zonder vooraf de handen te wassen. Dit werd aangegeven met een RR voor de ontwikkeling van microbiële keratitis van 1,49 (C.I.: 1,13-1,97). (Dart et al. 2008) De invloed van het type contactlens en duur van dragen op het risico om microbiële keratitis te ontwikkelen worden bevestigd door andere studies. Tabel 2 toont het overzicht van de jaarlijkse incidentie van contactlens gerelateerde microbiële keratitis die gerapporteerd werden door verschillende prospectieve studies. De incidentie verschilt van studie tot studie, maar voor alle vier de studies geldt dat de incidentie van contactlens gerelateerde keratitis toeneemt van harde naar zachte lenzen en hoger is bij “extende wear”. Met “extended wear” wordt bedoeld dat de lenzen continu (ook ’s nachts) gedragen worden gedurende een bepaalde periode. De duur van die periode werd niet gepreciseerd in de publicaties, volgens oogartsen.nl kunnen “extended wear” lenzen gebruikt worden gedurende 7 tot 30 dagen.

Tabel 2: Overzicht van publicaties die de incidentie van contactlens gerelateerde keratitis rapporteren in verhouding tot het type contactlens en de manier van gebruik.

Jaarlijkse incidentie van contactlens gerelateerde keratitis /10 000 contactlensdraggers			
	Harde, gaspermeabele lenzen, “daily wear”	Zachte contactlenzen, “daily wear”	Zachte contactlenzen, “extended wear”
Nederland (1996) (Cheng et al. 1999)	1,1 (C.I.:0,6-1,7)	3,5 (C.I.: 2,7-4,5)	20,0 (C.I.: 10,3-35,0)
Australië (2003-2004) (Stapleton et al. 2008)	1,2 (C.I.: 1,1-1,5)	1,9 (C.I.: 1,8-2,0)	19,5 (C.I.: 14,6-29,5)
Hong Kong (1997-1998) (Lam et al. 2002)	0,44 (C.I.: -)	3,09 (C.I.: -)	9,3 (C.I.: -)
Zweden (1993) (Nilsson et al. 1994)	1,48 (C.I.: -)	2,17 (C.I.: -)	13,33 (C.I.: -)

C.I.: betrouwbaarheidsinterval.
- : geen informatie beschikbaar.

“daily wear”: enkel gebruik overdag
“extended wear”: continu dragen gedurende bepaalde periode, ook ’s nachts.

Microbiële keratitis kan veroorzaakt worden door zowel bacteriën, fungi, virussen als amoeben, waarbij bacteriën de meest frequente oorzaak zijn. Tabel 3 (Keay et al. 2006) toont het voorkomen van de verschillende infectieuze agentia bij keratitis, in relatie tot de voorbeschikkende factoren.

Opvallend is dat 51% van de corneaschraapsels geen groei vertoonden, hoewel de vastgestelde diagnose microbiële keratitis was. In de bestudeerde populatie kwamen slechts vier gevallen van *Acanthamoeba keratitis* (AK) voor, waarvan er drie werden vastgesteld bij contactlensdragers.

Tabel 3: Cultuurresultaten van de cultuur van corneaschraapsels afgenomen bij patiënten met microbiële keratitis. (Key et al. 2006). (Herpes simplex virus werd geïdentificeerd bij 2 patiënten.)

Microbiological Result	Contact Lens Wear	Ocular Trauma	Ocular Surface Disease	Systemic Disease	Other	No Risk Factor	Multifactorial	All Microbial Keratitis
Gram-positive bacteria	24 (26%)	29 (31%)	7 (41%)	1 (25%)	0 (0%)	6 (30%)	5 (31%)	72 (27%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	5	4	—	—	0	1	10
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	17	16	3	1	—	6	4	46
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	4	—	—	—	—	—	4
Other <i>Streptococcus</i> species	3	1	—	—	—	—	—	4
<i>Corynebacterium</i> species	1	1	—	—	—	—	—	2
<i>Propionibacterium</i> species	2	1	—	—	—	—	—	3
Gram-negative bacteria*	14 (15%)	5 (5%)	3 (17%)	1 (25%)	1 (20%)	3 (15%)	2 (13%)	29 (11%)
Mixed gram-negative rods	1	—	—	—	—	—	—	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	1	—	1	—	—	1	10
<i>Serratia</i> species	5	1	—	—	—	1	—	7
<i>Haemophilus influenzae</i>	—	1	—	—	—	—	—	1
Other enteric species [†]	1	1	—	—	—	—	—	2
Other nonenteric species [‡]	—	1	3	—	1	3	1	9
Amoeba	3 (3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (5%)	0 (0.0%)	4 (1.5%)
<i>acanthamoeba</i>	3	—	—	—	—	1	—	—
Fungal	0 (0.0%)	3 (3.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (60%)	1 (5%)	0 (0.0%)	7 (2.6%)
Filamentous fungi [§]	—	3	—	—	2	1	—	—
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	—	1	—	—	—
Sterile samples	50 (55%)	56 (60%)	7 (41%)	2 (50%)	1 (20%)	9 (45%)	9 (56%)	135 (51%)
Total	91 (100%)	93 (100%)	17 (100%)	4 (100%)	5 (100%)	20 (100%)	16 (100%)	266 (100%)

The spectrum of organisms varied depending on the risk factor ($P < 0.001$).

Many samples were polybacterial (37/246 [15.0%]); therefore, total cases is not the sum of the counts for each organism.

*For 13/36 of the gram-negative specimens, gram-positive bacteria were also identified.

[†]Enteric bacteria included *Enterobacter agglomerans* and *Kingella kingae*.

[‡]Nonenteric bacteria, included *Bacillus* species, *Monaxella* species, *Proteus* species, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter koseri*, and *Aeromonas* species.

[§]Fungi included *Aspergillus fumigatus*, *Arthrographis kalrae*, *Trichosporon cutaneum*, and *Scedosporium prolificans*.

3 Contactlens gerelateerde *Acanthamoeba keratitis*: incidentie en risicofactoren

De lage incidentie van AK werd ook beschreven door Radford et al. (2002). Zij rapporteerden een jaarlijkse incidentie van 1,20 per miljoen volwassenen en 19,34 per miljoen contactlensdragers, in het Verenigd Koninkrijk. Het verband tussen het dragen van contactlenzen en het risico op AK werd bevestigd door Ross et al. (2014). Een retrospectieve analyse bij 116 patiënten waarbij AK was vastgesteld toonde dat 93,3% van de patiënten contactlenzen gebruikte. Eveneens Lam et al. (2002) suggereerden een verband tussen AK en het gebruik van contactlenzen, waarbij 5/6 patiënten met AK contactlenzen gebruikten. De resultaten van een studie uitgevoerd door Radford et al. (1998), in het Verenigd Koninkrijk, toonde dat 93% (225/243) van de patiënten gediagnosticeerd met AK gebruikers waren van contactlenzen en dat 84% (205/243) zachte contactlenzen gebruikte. De ontwikkeling van contactlens gerelateerde AK wordt voornamelijk waargenomen bij zwemmen met de lenzen of bij onvoldoende hygiëne. Radford et al. (1998) rapporteerden in een retrospectieve studie uitgevoerd tussen 1992 en 1996 in het Verenigd Koninkrijk bij AK patiënten, dat het niet correct onderhouden van het bewaardoosje voor de contactlenzen leidde tot kolonisering met

Acanthamoeba bij 63% van de geteste doosjes. Zwemmen met contactlenzen werd aangeduid als risicofactor voor de ontwikkeling van AK bij 78% van de patiënten.

4 Diagnose, behandeling en prognose van *Acanthamoeba* keratitis

De klinische presentatie van AK verschilt weinig van bacteriële of virale keratitis (Fig. 2a). Het is vaak pas bij therapiefalen dat *Acanthamoeba* in overweging genomen worden als mogelijke oorzaak. De vroegtijdige symptomen zijn roodheid van het oog, wazig zicht, pijn, overvloedige traanproductie en fotofobie. Klinisch zijn er epitheliale letsels met vertroebelingen, kleine beschadigingen en infiltraten zichtbaar. AK wordt getypeerd door een ringvormig infiltraat (Fig. 2b en 2c), maar dit verschijnt pas later en bij ongeveer 83% van de patiënten. (Thompson P 2007 masterthesis)

De diagnose van AK berust op de anamnese, het oogonderzoek en de cultuur van een representatief staal, bij voorkeur een corneaschraapsel. (Richtlijn American Academy of Ophthalmology: Bacterial keratitis PPP 2013)

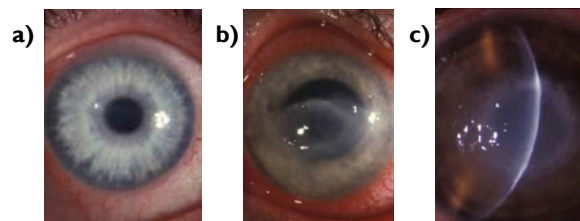


Fig. 2: (a) Vroege manifestatie van AK, dit stadium wordt gemakkelijk verward met andere oorzaken van keratitis. (b) Ringvormig infiltraat, typerend voor AK. (c) Beeld van het infiltraat bij AK, met de biomicroscop. (Bron: <http://www.cdc.gov/parasites/Acanthamoeba>; geconsulteerd op 27/04/2014).

AK is net als andere oorzaken van keratitis een infectie die het zicht bedreigt. De prognose is afhankelijk van de snelheid van diagnose. Tabel 4 werd overgenomen uit een publicatie van **Claerhout et al. (2004)**. Zij hebben aangetoond in een retrospectieve studie bij 14 patiënten dat de diagnose en behandeling binnen 18 dagen na aanvang van de symptomen (groep I) een beter herstel geeft van het zicht dan bij laattijdige diagnose en behandeling (groep II). Het zicht van de patiënten werd geëvalueerd aan de hand van de Snellen letterkaart. Bij sommige patiënten was het zicht zodanig achteruitgegaan dat het beperkt was tot het tellen van vingers (CF in tabel 4) of het waarnemen van bewegingen (HM in tabel 4). Tabel 4 toont dat 13/14 patiënten aanvankelijk een foutieve diagnose gekregen hadden, wat te wijten is aan de specifieke symptomen. De diagnose van AK werd bevestigd aan de hand van cultuur, maar bij twee patiënten bleef de cultuur negatief en werd de diagnose gesteld op basis van de klinische bevindingen en bevestigd door een goede respons op de therapie. Ook werd in deze studie slechts bij vier patiënten een ringinfiltraat waargenomen, alle vier die patiënten behoorden tot groep II.

De studie van Claerhout et al. (2004) toont dat de klinische outcome bepaald wordt door het interval tussen het ontstaan van de infectie en de start van de behandeling. De grootte van de

bestudeerde populatie was echter beperkt, maar een gelijkaardig verband werd gerapporteerd door Radford *et al.* (1998).

Tabel 4: Overzicht van de patiënten met AK in de studie van Claerhout *et al.* 2004.

(neg negative, pos positive, nd not done; BCVA best-corrected visual acuity (Snellen letterkaart),

HM hand movements, CF counting fingers)

Case	Sex/age (years)	Misdiagnosis	Method of diagnosis				Delay in therapy (days)	BCVA after medical treatment	Follow-up period (months)
			Culture from corneal scraping	Culture from contact lens case	Biopsy/histo-pathology	Clinical findings only			
Group I									
1	F/19	Bacterial ulcer	neg	pos	nd	–	5	20/20	5
2	M/64	Bacterial ulcer	neg	nd	pos	–	7	HM	4
3	F/23	–	nd	nd	nd	Yes	3	20/20	1
4	M/23	Bacterial ulcer	pos	nd	nd	–	4	20/20	4
5	M/21	Keratoconjunctivitis	neg	pos	nd	–	15	20/20	30
6	F/29	Keratoconjunctivitis	neg	pos	nd	–	17	20/20	3
Group II									
7	M/29	Keratoconjunctivitis	pos	nd	nd	–	27 (1 month)	20/200	16
8	M/19	Conjunctivitis	neg	pos	nd	–	30 (1 month)	20/40	5
9	M/39	HSV	neg	nd	pos	–	34 (1 month)	HM	14
10	M/36	HSV	pos	neg	nd	–	199 (6.5 months)	CF	44
11	M/25	Bacterial ulcer	neg	nd	nd	Yes	25 (1 month)	20/60	25
12	M/50	Fungal keratitis	neg	neg	pos	–	28 (1 month)	HM	63
13	M/19	Bacterial ulcer	neg	pos	nd	–	49 (1.5 months)	20/20	4
14	F/48	HSV	neg	pos	pos	–	32 (1 month)	HM	52

De behandeling van AK bestaat uit de lokale toediening van propamide gecombineerd met chloorhexidine of polyhexamethylene biguanide (PHMB). Soms wordt de *Acanthamoeba* therapie gecombineerd met antifungale of antibacteriële middelen. (Claerhout *et al.* 2004) In UZ Leuven wordt een combinatie van propamide met PHMB gebruikt voor de behandeling van AK. De oogdruppeltjes worden iedere 30 minuten of elk uur afwisselend aangebracht, gedurende enkele maanden. Bij een vergevorderd letsel is corneatransplantatie aangewezen. In de studie van Claerhout *et al.* (2006) was dit noodzakelijk bij een patiënt uit groep I en bij vijf patiënten uit groep II.

5 Acanthamoeba

Het genus *Acanthamoeba* behoort tot het rijk van de protozoa. Het zijn eencelligen die aanwezig zijn in oppervlaktewateren, zwembaden, kraantjeswater, ventilatie- en airconditioning systemen... Het zijn opportunistische pathogenen die keratitis kunnen veroorzaken bij dragers van contactlenzen, of granulomateuze amoeben encefalitis bij immuungecompromitteerde patiënten.

Acanthamoeba hebben twee ontwikkelingsstadia; de trofozoieten en de cysten. Beide vormen kunnen toegang krijgen tot het menselijk lichaam via de ogen, de luchtwegen of huidletsels (Fig. 3).

(Bron: <http://www.cdc.gov/dpdx/freelivingAmebic/index.html>, geconsulteerd op 27/04/2014)

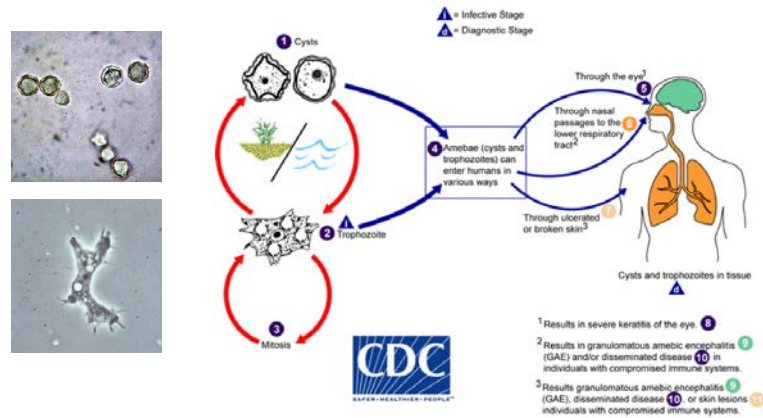


Fig. 3: Levenscyclus van *Acanthamoeba spp.* en de menselijke blootstelling. De *Acanthamoeba* komen voor als trofozoïeten en cysten. Links worden microscopische beelden getoond van beide ontwikkelingsstadia (Bron: <http://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic>; geconsulteerd op 27/04/2014)

Acanthamoeba worden onderverdeeld in 17 genotypes op basis van de sequentie van het 18S rRNA; T1-T17. Een studie uitgevoerd door **Maciver et al. (2013)** toont dat het T4 genotype het meest frequent voorkomt in de omgeving en eveneens de meest frequente oorzaak is van AK (Fig. 4). Dit wordt bevestigd in een andere studie, van Risler et al. (2013). Zij vergeleken de genotypes van 20 *Acanthamoeba* isolaten uit AK en vonden een prevalentie van 80% voor het T4 genotype. De andere frequent voorkomende genotypes waren genotype T3 en T11.

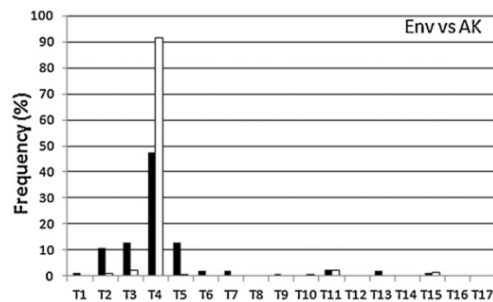


Fig. 4: Het voorkomen van de verschillende *Acanthamoeba* genotypes in de menselijke leefomgeving ■ en bij AK □. (Maciver et al. 2013)

6 Methodes voor het stellen van de diagnose van *Acanthamoeba keratitis*

In UZ Leuven wordt de diagnose van AK bevestigd via cultuur en microscopie.

6.1 Cultuur van *Acanthamoeba*

Acanthamoeba worden in cultuur gebracht op een nutriëntarme voedingsbodem, waarop *E. coli* werden geïncubeerd. Deze bodem wordt geïncubeerd bij 30°C en groei wordt met behulp van microscopie waargenomen (Fig. 3). Stalen die kunnen dienen voor cultuur, zijn: contactlenzen, contactlensvloeistoffen, stalen uit de bewaardoosjes voor de contactlenzen, corneaschraapsels of -biopsies. Een belangrijke opmerking die hierbij gemaakt dient te worden is dat wanneer *Acanthamoeba* gekweekt worden uit de contactlensvloeistof, de contactlens, of het bewaardoosje, dit geen 100% sluitend bewijs vormt voor de aanwezigheid van *Acanthamoeba* als oorzaak van de keratitis. (Mandell, Claerhout *et al.* 2004)

Bij cultuur van stalen voor *Acanthamoeba* in UZ Leuven worden deze dagelijks nagekeken op groei, vanaf twee dagen na de aanvang. Een overzicht van de resultaten van de cultuuraanvragen gedurende het afgelopen jaar toont dat de antwoordtijd voor een positieve *Acanthamoeba* cultuur varieerde tussen twee en vier dagen (Attachment 1). Na een incubatie van vijf dagen wordt de cultuur negatief geantwoord indien geen groei werd waargenomen.

Zoals getoond in Tabel 3, is de gevoeligheid van cultuur voor het vinden van het infectieuze agens bij keratitis 49%. (Keay *et al.* 2006) **Bacon et al. (1993)** hebben aangetoond dat het succes van de cultuur voor *Acanthamoeba* afhankelijk is van het tijdstip van afname sinds de aanvang van de symptomen. Cultuur van vroegtijdig afgenomen monsters van de cornea (< 28 dagen) was positief bij 54%. Stalen afgenomen na 1-2 maanden of > 2 maanden sinds de aanvang van de symptomen, resulteerden bij respectievelijk 71% en 74% in een positieve cultuur. Cultuur van de contactlenzen, contactlensdoosjes of -vloeistoffen, was positief bij 11%. Bij een negatieve cultuur werd de diagnose van AK gesteld op basis van de symptomen en een goede respons op de behandeling. (Bacon *et al.* 1993)

6.2 Rechtstreeks microscopisch onderzoek

Om de diagnose van AK te versnellen, worden in UZ Leuven corneaschraapsels gekleurd met de PAS kleuring en microscopisch bekeken, op zoek naar *Acanthamoeba* cysten (Fig. 5). De gevoeligheid van deze methode is echter afhankelijk van de ervaring van de uitvoerder. (Itahashi *et al.* 2011) Maar het voordeel van microscopie is dat ook andere oorzaken van keratitis waargenomen kunnen worden, bijvoorbeeld fungi.

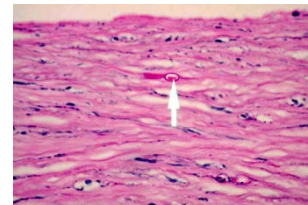


Fig. 5: PAS kleuring van corneaschraapsel. De *Acanthamoeba* cyste wordt aangeduid met de pijl.
(<http://www.images.missionforvisionusa.org/>;
geconsulteerd op 27/04/2014)

QUESTION(S)

Vanwege de lange antwoordtijd en de in de literatuur beschreven beperkte gevoeligheid van cultuur en microscopie, werd de vraag gesteld of een moleculaire methode kan bijdragen aan de diagnose van AK.

1) *Vraag 1*

Heeft PCR een meerwaarde bij de diagnose van contactlens gerelateerde *Acanthamoeba* keratitis?

2) *Vraag 2*

Is er plaats om een moleculair diagnostische methode op te starten in UZ Leuven?

SEARCH TERMS

1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Acanthamoeba [MeSH, main topic] AND Acanthamoeba keratitis [MeSH, main topic] AND Polymerase chain reaction [MeSH, main topic]"*.

2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters Acanthamoeba keratitis (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)*

3) *National Guideline Clearinghouse (www.guideline.gov): Bacterial keratitis*

4) *UpToDate Online version 12.2 (2004)*

Free-living amebas

Keratitis (Complications of contact lenses)

5) *Naslagwerken*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1) *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*

American Academy of Ophthalmology Cornea/External Disease Panel. Bacterial keratitis preferred practice pattern. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2013.

2) *Reviews*

Clarke B, Sinha A, Parmar DN, Sykakis E. Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *J Ophthalmol* (2012).

Thomas PA, Geraldine P. Infectious keratitis. *Curr Opin Infect Dis* (2007) 20:129-141.

4) *Original Articles*

Bacon AS, Frazer DG, et al. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. *Eye* (1993) 7:719-725.

Cavanagh HD, Ladage P, et al. Effects of daily and overnight wear of hyper-oxygen transmissible rigid and silicone hydrogel lenses on bacterial binding to the corneal epithelium: 13-month clinical trials. *Eye & Contact lens* (2003) 29(1S):S14-S16.

Cheng KH, Leung SL, et al. Incidence of contact-lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. *The Lancet* (1999) 354:181-185.

Claerhout I, Goegebuer A, Van Den Broecke C, Kestelyn P. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2004) 42(8):648-653.

Dart JKG, Radford CF, et al. Risk factors for microbial keratitis with contemporary contact lenses. *Ophthalmol* (2008) 115(10):1647-1654.

Itahasi M, Higaki S, Fukuda M, Mishima H, Shimomura Y. Utility of real-time polymerase chain reaction in diagnosis and treating *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* (2011) 30(11):1233-1237.

Key L, Edwards K, et al. Microbial keratitis: predisposing factors and morbidity. *Ophthalmol* (2006) 113:109-116.

Key L, Stapleton F. Development and evaluation of evidence-based guidelines on contact lens-related microbial keratitis. *Cont Lens Anterior Eye* (2008) 31:3-12.

Khairnar K, Tamber GS, Ralevski F., Pillai DR. Comparison of molecular diagnostic methods for the detection of *Acanthamoeba* spp. from clinical specimens submitted for keratitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* (2011) 70:499-506.

Lam DSC, Houang E, et al. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. *Eye* (2002) 16:608-618.

Laummaunwai P, Ruangjirachuporn, W, Boonmars T. A simple PCR condition for detection of a single cyst of *Acanthamoeba* species. *Parasitol Res* (2012) 110:1569-1572.

Maciver SK, Asif M, Simmen MW, Lorenzo-Morales J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *Eur J Protistol* (2013) 49:217-221.

Mathers WD, Nelson SE, et al. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol* (2000) 118:178-183.

Maubon D, Dubosson M, et al. A one-step multiplex PCR for *Acanthamoeba* keratitis diagnosis and quality samples control. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2012) 53(6):2866-2872.

Nilsson SEG, Montan PG. The annualized incidence of contact lens induced keratitis in Sweden and its relation to lens type and wear schedule: Results of a 3-month prospective study. *CLAO J* (1994) 20(4):225-230.

Pasricha G, Sharma S, Garg P, Aggarwal RK. Use of 18S rRNA gene-based PCR assay for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India. *J Clin Microbiol* (2003) 41(7):3206-3211.

Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol* (2006) 44(10):3589-3595.

Radford CF, Lehmann OJ, Dart JKG. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-1996. *Br J Ophthalmol* (1998) 82:1387-1392.

Radford CF, Minassian DC, Dart JKG. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol* (2002) 86:536-542.

Risler A, Coupa-Goutaland B, Pélandakis M. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. *Parasitol Res* (2013) 112:3807-3816.

Rivière D, Szczebara FM, Berjeaud JM, Frère J, Héchard Y. Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *J Microbiol Meth* (2006) 64:78-83.

Ross J, Roy SL, et al. Clinical characteristics of *Acanthamoeba* keratitis infections in 28 states, 2008 to 2011. *Cornea* (2014) 33(2):161-168.

Schroeder JM, Booton GC, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* (2001) 39(5):1903-1911.

Seal DV, Kirkness SM, Bennett HGB, Peterson M. Population-based cohort study of microbial keratitis in Scotland: incidence and features. *Cont Lens Anterior Eye* (1999) 22(2):49-57.

Stapleton F, Keay L, et al. The incidence of contact lens-related microbial keratitis in Australia. *Ophthalmol* (2008) 115:1655-1662.

Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RMQ, Gordon YJ. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol* (2008) 46(10):3232-3236.

Yera H, Zamfir O, *et al.* Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2006) 26:221-224.

5) Reference Works, Handbooks and Databases

Principles and practice of infectious diseases. 6th edition 2005. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Elsevier: 1395-1406.

6) Posters, "grey literature", presentations

Thompson P. Laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using the Cepheid Smartcycler®II and the effects of topical ophthalmic drugs on real-time PCR. Master's Thesis University of Pittsburgh, BMedSc, Australia (2007).

Achtergrondinformatie; www.oogartsen.nl (laatst geconsulteerd op 03/05/2014).

Achtergrondinformatie; www.debelgischeoptiekguids.be (laatst geconsulteerd op 03/05/2014).

Achtergrondinformatie; www.cdc.gov (laatst geconsulteerd op 27/04/2014).

I Meerwaarde van moleculaire diagnostiek?

Zoals eerder vermeld (Tabel 3) kan de diagnose van microbiële keratitis slechts bij 49% bevestigd worden aan de hand van een positieve cultuur. Ook de diagnose van AK wordt niet steeds bevestigd met microscopie en/of cultuur. (Tabel 4 en Bacon *et al.* 1993) Mogelijks kunnen moleculaire technieken bijdragen tot het stellen van de diagnose.

Yera *et al.* (2006) hebben aangetoond dat de gevoeligheid van rechtstreeks microscopisch onderzoek en/of cultuur inferieur is aan een moleculaire methode. Over een periode van 24 maanden (2001-2003), hebben zij microscopie, cultuur en PCR uitgevoerd op corneaschraapsels van patiënten met tekenen van AK die zich aandienden in het Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts (Frankrijk). In totaal werden er 513 stalen onderzocht, waarvan 12 patiënten gediagnosticeerd werden met AK. Voor microscopische analyse werden de stalen gekleurd met de May-Grumwald-Giemsa kleuring en bekeken bij een 1.000 x vergroting. De cultuur gebeurde in fysiologisch water waaraan dode *E. coli* bacteriën werden toegevoegd, en werd geïncubeerd bij 30°C gedurende maximaal 15 dagen. Als moleculaire techniek werd de Nelson-methode, een gel-based methode toegepast (Mathers *et al.* 2000). Wanneer deze negatief was bij een positief resultaat voor microscopie of cultuur, werden bijkomende PCR analyses gedaan. De resultaten van deze studie worden getoond in Tabel 5. In totaal werden 15 stalen onderzocht van de 12 patiënten met AK. Rechtstreeks microscopisch onderzoek gaf een positief resultaat bij 5/15 stalen en cultuur slechts bij 1/15. De Nelson-PCR daarentegen was positief bij 12/16 stalen, en in combinatie met de bijkomende PCR methodes werd de gevoeligheid nog verhoogd tot 13/16, of 94%. De sequentie van de amplicons werd bepaald om te verzekeren dat er *Acanthamoeba* DNA werd gedetecteerd. Bij alle 12 patiënten kon het genotype van de *Acanthamoeba* bepaald worden. Het staal van patiënt nummer 13 vertoonde een positieve reactie met de Nelson PCR-methode, maar sequencing toonde de aanwezigheid van DNA afkomstig van de amoebe *Vexilliferidae*.

Maubon *et al.* (2012) ontwikkelden een real-time qPCR assay om *Acanthamoeba* te detecteren in oculaire specimens. Deze assay werd uitgetest op 21 stalen van corneaschraapsels die werden afgenomen voor *Acanthamoeba* cultuur. Drie stalen gaven een positief resultaat voor de qPCR en een negatief resultaat voor zowel rechtstreeks microscopisch onderzoek als cultuur. Deze drie stalen werden beschouwd als werkelijk positief. Geen enkel staal gaf een positief resultaat voor microscopie of cultuur. Het rechtstreeks microscopisch onderzoek gebeurde na May-Grunwald-Giemsa kleuring. Voor de cultuur werden de stalen aangebracht op nutriëntarme voedingsbodems met daarop *E. coli* geïnculeerd, incubatie gebeurde gedurende maximum 21 dagen bij 27°C. Uit deze beperkte studie werd besloten dat de ontwikkelde qPCR methode een betere gevoeligheid heeft en bijdraagt tot de diagnose van AK.

Tabel 5: Resultaten bekomen met microscopie, cultuur en PCR op corneastalen van 513 patiënten met mogelijk AK. (Yera et al. 2006)

Patient number	Corneal sample code ^a	Time period ^b (weeks)	Prior treatment ^c	ME	Culture	PCR ^d			Genotype ^e
						Nelson	ACARNA	JDP	
AK ^f									
1	29AND	3	V	-	+	-	+	+	T4
2	33SIS	9	V	-	-	+	+	+	T4
	68SIS	19	-	+	-	+	+	+	
3	93GUIL ^g	8	B+V	+	-	+	+	+	T11
	143GUIL	20	-	-	-	+	+	+	
	308GUIL	41	-	ND ^h	ND ^h	+	+	+	
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
Non-AK ^f									
13	107MAR	2	B+V	-	-	+	-	-	ND
14 to 513	NS	NS	NS	-	-	-	ND	ND	-

^a Corneal scrapings

^b Time period from onset of clinical signs

^c B topical antibacterial agents (ciprofloxacin, gentamicin, norfloxacin, ofloxacin, piperacillin, rifamycin, tobramycin), K keratoplasty, V topical antiviral agents (acyclovir, ganciclovir, valaciclovir)

^d Nelson Nelson primer pair, ACARNA ACARNA.1383for-1655rev primers, JDP JDP1 and JDP2 primers

^e According to BLAST analysis

^f At the date of sampling

^g Corneal biopsy

^h Due to insufficient samples

NS not specified, ME microscopic examination, ND not determined

1.1 Moleculaire technieken

Gedurende het afgelopen decennium werden verscheidene PCR methodes ontwikkeld. Naast de vele in-house ontwikkelde moleculaire methodes, werden vier methodes verder geëvalueerd in de literatuur. Hiertoe behoorden twee gel-based PCR methodes (Nelson-PCR (Mathers et al. 2000) en JCP-PCR (Schroeder et al. 2001)) en twee real-time qPCR methodes (Rivière (Rivière et al. 2006) en Qvarnstrom (Qvarnstrom et al. 2006)). Bij een gel-based methode wordt het amplicon na de PCR reactie, gedetecteerd via agarose gel electroforese. Bij real-time qPCR gebeurt de detectie van het amplicon al tijdens de PCR reactie. De detectie is gebaseerd op het hybridiseren van een probe die gelabeld werd met een fluorescente merker enerzijds en een quenching molecule anderzijds. Door polymerisatie van de DNA-streng en afbraak van de gehybridiseerde probe zal de fluorescente merker verder verwijderd worden van de quencher en wordt de fluorescentie detecteerbaar. De herhaaldelijke polymerisatie stappen zullen leiden tot een exponentiële toename van de fluorescentie. Resultaten van qPCR worden uitgedrukt als C_t-waarde, die de temperatuurcyclus aangeeft vanaf dewelke het fluorescente signaal de threshold overschrijdt. Omwille van praktische overwegingen gaat de voorkeur uit naar een qPCR methode, de bespreking van de literatuur zal hiertoe beperkt worden.

Er werden verscheidene publicaties gevonden van in-house ontwikkelde qPCR methodes. (Maubon *et al.* 2012, Pasricha *et al.* 2003, Itahashi *et al.* 2011) Allen kwamen zij tot het besluit dat qPCR assay een vergelijkbare of verbeterde gevoeligheid heeft ten opzichte van microscopie en/of cultuur en dat die kan bijdragen de diagnose van AK. Twee methodes, de Rivière qPCR en de Qvarnstrom qPCR werden meer uitvoerig getest en zullen in de volgende paragrafen besproken worden. Beide qPCR reacties zijn gebaseerd op de sequentie van het 18S rRNA van *Acanthamoeba*. Rivière *et al.* (2006) hebben een primer-probe combinatie geselecteerd die selectief was voor de detectie van *Acanthamoeba*. Qvarnstrom *et al.* (2006) ontwikkelden een triplex qPCR assay die toelaat om verschillende amoebenspecies te detecteren. De species binnen de scope van de Qvarnstrom assay zijn *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* en *Acanthamoeba*. Evaluatie van de Rivière qPCR methode door Qvarnstrom *et al.* (2006), toonde dat de Rivière qPCR niet in staat was om alle genotypes van *Acanthamoeba* te detecteren. De primer-probe combinatie die ontworpen werd door Rivière *et al.* (2006), zou zich bevinden in een niet-geconserveerde zone van het *Acanthamoeba* genoom. De specificiteit van de Rivière qPCR werd goed bevonden door Qvarnstrom *et al.* 2006. (Qvarnstrom *et al.* 2006) De genotypes die ontsnapten aan de Rivière qPCR waren genotype T7 en T10, die echter zelden voorkomen als verwekkers van AK (Fig. 4). (Maciver *et al.* 2013)

1.2 Vergelijking van Rivière en Qvarnstrom qPCR voor de diagnose van *Acanthamoeba* keratitis

Verscheidene onderzoeksgroepen analyseerden de performantie van de Rivière en Qvarnstrom qPCR methodes voor het stellen van de diagnose van AK. Als referentiemethode werden rechtstreeks microscopisch onderzoek en/of cultuur gebruikt.

a) **Khairnar K *et al.* (2011)**

De studiepopulatie bestond uit 128 patiënten met het vermoeden van AK. In totaal werden 128 stalen geanalyseerd door het Public Health Laboratory in Toronto (Canada). De onderzochte staaltypes waren corneaschraapsels, contactlenzen, oogwissers, wissers van het cornealetsel, traanvocht en biopsies. Bij 21,8% van de patiënten was het resultaat van de microscopie en/of cultuur positief. Tabel 6 toont de prestaties van de qPCR analyses, in verhouding tot microscopie en/of cultuur. De sensitiviteit van beide qPCR methodes om *Acanthamoeba* DNA te detecteren verschilt niet, maar de specificiteit van de Rivière methode is lager dan die van de Qvarnstrom methode.

De lagere specificiteit van de Rivière qPCR is te wijten aan de detectie van *Acanthamoeba* DNA in 11 van de 100 stalen die negatief beoordeeld werden aan de hand van microscopie en/of cultuur. Van deze 11 stalen, waren er 2 ook positief met een andere moleculaire methode. Van de negen resterende stalen, waren er vijf waarin ook amplificatie optrad met de Qvarnstrom methode maar de resulterende C_t waarden waren groter dan de aangenomen cut-off om een resultaat als positief te klasseren. De 11 positieve resultaten van de Rivière qPCR werden beschouwd als vals positief, maar er werd geen informatie meegedeeld over de uiteindelijke diagnose. Het zou echter ook mogelijk zijn

dat deze II als vals positief bestempelde resultaten een weerspiegeling zijn van de verhoogde sensitiviteit van een moleculaire methode ten opzichte van microscopie en/of cultuur, zoals hierboven aangegeven door Yera *et al.* 2006 en Maubon *et al.* 2012.

Tabel 6: Sensitiviteit en specificiteit van de PCR methodes (Nelson en JDP) en qPCR methodes (Rivière en Qvarnstrom) in verhouding tot de standaardmethode microscopie/cultuur. (Khairnar *et al.* 2011)

Assay type	Microscopy and/or culture	
	Sensitivity ^a	Specificity ^b
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)
Qvarnstrom-QPCR	82.1% (95% CI, 64.41–92.12)	98% (95% CI, 93–99.45)
Rivière-QPCR	89.3% (95% CI, 72.80–96.29)	89% (95% CI, 81.37–93.75)
Microscopy and/or culture	NA ^c	NA

^a Sensitivity: number of true positives divided by number of true positives plus false negatives $\times 100$.

^b Specificity: number of true negatives divided by the number of true negatives plus false positives $\times 100$.

^c Not applicable.

Ook de relatie tussen het type staal en de resultaten van de moleculaire technieken werd bekeken. Er werd geconcludeerd dat de gevoeligheid van de methode varieert volgens het type staal (Tabel 7). Voor de analyse van contactlenzen en contactlensvloeistoffen komen de resultaten van de qPCR assays bijna volledig overeen met die van microscopie en/of cultuur. De Rivière qPCR detecteerde *Acanthamoeba* DNA in 17/19 corneaschraapsels die positief waren met microscopie en/of cultuur en in 6 corneaschraapsels die negatief waren met de referentiemethode. Eveneens analyse van drie wissers van de cornea, een oogwisser en een biopsie waren positief voor *Acanthamoeba* DNA wanneer geanalyseerd met de Rivière methode en negatief voor microscopie en/of cultuur. De Qvarnstrom qPCR daarentegen detecteerde slechts *Acanthamoeba* DNA in 15/19 corneaschraapsels die positief waren met microscopie en/of cultuur. Met deze methode werd *Acanthamoeba* DNA gevonden in 2 corneaschraapsels die negatief waren voor microscopie en/of cultuur. Deze twee stalen waren ook positief met de Rivière qPCR. De Qvarnstrom qPCR vond geen *Acanthamoeba* DNA in de cornea- of oogwissers, of in de biopsie.

Tabel 7: Invloed van het staaltipe op het resultaat van de moleculaire technieken. (Khairnar *et al.* 2011)

Clinical specimen type	Positive by microscopy and/or culture	Positive by Nelson-PCR	Positive by JDP-PCR	Positive by Riviere-QPCR	Positive by Qvarnstrom-QPCR
Contact lens solution (<i>n</i> = 5)	4	4	3	4	4
Contact lens (<i>n</i> = 14)	5	3	4	4	4
Corneal scraping (<i>n</i> = 66)	19	7	9	23	17
Eye scraping (<i>n</i> = 3)	0	0	0	0	0
Eye swab (<i>n</i> = 8)	0	0	1	1	0
Corneal ulcer swab (<i>n</i> = 3)	0	0	0	0	0
Vitreous fluid (<i>n</i> = 1)	0	0	0	0	0
Tap water (<i>n</i> = 1)	0	0	0	0	0
Corneal biopsy (<i>n</i> = 1)	0	0	0	0	0
Tissue biopsy eye (<i>n</i> = 1)	0	0	0	1	0
Corneal swab (<i>n</i> = 23)	0	1	0	3	0
Unknown (<i>n</i> = 2)	0	0	0	0	0
Total	28	15	17	36	25

Het verschil tussen de prestaties van de Rivière en Qvarnstrom qPCR werd verklaard door technische verschillen tussen beide methodes, zoals de keuze van de primers en de lengte van het amplicon. Dit maakt dat de Rivière qPCR betere technische karakteristieken zoals reproduceerbaarheid en lineaire correlatie vertoonde (zie Tabel 9). Ook de mogelijkheid van de Rivière qPCR om *Acanthamoeba* te detecteren in stalen die op een minder invasieve methode werden genomen dan corneaschraapsels, kan als veelbelovend beschouwd worden (Tabel 7). Er werd finaal geconcludeerd dat qPCR moet geïmplementeerd worden voor de routine diagnose van AK, maar er werd geen voorkeur gegeven aan een van de twee methodes, of voor een bepaald staaltipe.

b) Thompson P. et al. (2008)

De Rivière en Qvarnstrom qPCR methodes werden toegepast op 168 stalen van patiënten met een vermoeden van AK. De resultaten worden samengevat in Tabel 8. Van de 11 stalen die positief bevonden werden met beide moleculaire methodes, waren er 7 cultiveerbaar. Ook hier geeft de Rivière qPCR een positief resultaat voor twee stalen, die negatief testten met de Qvarnstrom qPCR. De betere performantie van de Rivière qPCR werd verklaard door de superieure technische karakteristieken (Tabel 9). Om de technische performantie van de methodes te analyseren, werden twee aparte plasmides aangemaakt die beiden een van de doelwit sequenties bevatten. Er werd dus een plasmide gemaakt voor de Rivière qPCR en een voor de Qvarnstrom qPCR. Gebruik makend van de respectievelijke plasmides scoorde de Rivière qPCR beter dan de Qvarnstrom qPCR voor wat betreft de laagste detectielimiet, lineariteit van de C_t waarden bij verschillende concentraties van het plasmide DNA, en de amplificatie-efficiëntie (AE). Wanneer DNA geïsoleerd werd uit gekweekte *Acanthamoeba* trofozoïeten en cysten kon echter geen verschil waargenomen worden tussen de Rivière en Qvarnstrom qPCR (Tabel 9).

Tabel 8: Resultaten van de Rivière en Qvarnstrom qPCR op patiëntenstalen. (Thompson et al. 2008)

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

^a "Indeterminate" indicates a sample that tested positive initially, but the result was not reproducible. "Inhibitory" indicates samples where the internal control tested negative after extraction and re-extraction.

^b Nine cornea and two CL cases. Seven were culture positive, real-time PCR positive, and four were culture negative, real-time PCR positive.

^c One cornea, one CL solution bottle.

^d 95 cornea, 32 CL cases, 20 CL solution bottles, 1 eyelid, 1 conjunctiva and eyelid.

^e Two cornea, one CL case.

^f One CL case.

^g Two CL cases.

Tabel 9: Technische prestaties van de Rivière en Qvarnstrom qPCR. (Thompson et al. 2008)

Parameter	Assay	
	Rivière	Qvarnstrom
Lowest dilution (plasmid DNA)	10 ⁻¹¹	10 ⁻⁹
LOD (mean no. of copies/10 µl)	11.3	43.8
LOD (mass [ag])	38.12	157.75
Correlation coefficient r ² (%)	99.8	99.2
AE (%)	94	92
LOD ^a (mean no. of trophozoites/10 µl)	2.3	2.3
LOD ^a (mean no. of cysts/10 µl)	0.7	0.7

^a Data represent the results of two experiments.

De studie van Thompson et al. 2008 evalueerde ook het effect van bepaalde lokale medicatie op de amplificatie met de Rivière qPCR methode (Tabel 10). Er werd een verdunningsreeks van het product aangemaakt en daaraan werd de Rivière plasmide (1,13*10⁵ kopieën) toegevoegd. De meeste geneesmiddelen geven geen of een kleine inhibitie van de amplificatie. De geneesmiddelen die wel een invloed hadden op de performantie van de Rivière qPCR waren amfotericine B, trifluridine, propamidine, PHMB en chloorhexidine. Van deze producten werden die met een minimaal inhiberende verdunning boven 1/20 niet weerhouden omdat daarvan verondersteld werd dat zij niet aan die hoge concentraties aanwezig zouden zijn na staalname en DNA extractie. Voor de producten met een minimaal inhiberende verdunning onder 1/20 werd de invloed op de Rivière qPCR reactie opnieuw getest na extractie van het plasmide DNA. Dit toonde dat het inhiberend effect van trifluridine volledig verdwenen was, maar voor PHMB bleef de inhibitie bestaan. Er dient opgemerkt te worden dat deze experimentele analyse niet bevestigd werd in de klinische context.

Tabel 10: Inhibitie van DNA amplificatie in aanwezigheid van geneesmiddelen. Het inhiberend vermogen van het geneesmiddel wordt uitgedrukt als "Minimal inhibitory dilution". Dit wijst op de laagste concentratie, of hoogste verdunning waarbij inhibitie aanwezig was. (Thompson et al. 2008)

Drug	Minimal inhibitory dilution	AE
Proparacaine (anesthetic)	1/1	100.1
Prednisolone (steroid)	1/1	91.2
Bromfenac (nonsteroidal)	1/1	97.4
Nepafenac (nonsteroidal)	1/10	95.0
Gatifloxacin (antibiotic)	1/10	92.6
Moxifloxacin (antibiotic)	1/10	92.0
Tobramycin (antibiotic)	1/1	102.9
Cefazolin (antibiotic)	1/10	91.6
Amphotericin B (antifungal)	1/1	108.7
Trifluridine (antiviral)	1/40 ^a	94.6
Propamidine (antiacanthamoebic)	1/10	85.7
Polyhexamethylene biguanide (antiacanthamoebic)	1/640 ^b	72.7
Chlorhexidine (antiacanthamoebic)	1/10	77.0
Corneal tissue	1/1	86.9

^a Trifluridine inhibition was removed completely after DNA extraction (1/1).

^b Polyhexamethylene biguanide inhibition was still present after DNA extraction (the minimal inhibitory dilution improved onefold to 1/320).

De studie van Thompson et al. 2008 kwam tot het besluit dat moleculaire technieken nuttig zijn als aanvulling op microscopie en/of cultuur en dat staalname moet gebeuren alvorens een behandeling met PHMB opgestart wordt. Tevens werd het belang onderstreept van de DNA extractie methode

die gebruikt wordt. Enerzijds moet de DNA extractie erop gericht zijn om het DNA zo minimaal mogelijk te beschadigen en anderzijds moet die methode in staat zijn om ook DNA uit de meer bestendige cysten te isoleren. (Laummaunwai *et al.* 2012)

2 Toepasbaarheid van moleculaire diagnostiek op *Acanthamoeba* in UZ Leuven?

In UZ Leuven gebeurt de diagnose van AK via rechtstreeks microscopisch onderzoek van een corneaschraapsel gecombineerd met cultuur van contactlenzen, corneaschraapsels en/of contactlensvloeistoffen. Attachment I toont een overzicht van de *Acanthamoeba* analyses uitgevoerd tussen 01/01/2013 en 31/03/2014. De resultaten voor de cultuur werden aangevuld met de resultaten van het rechtstreeks microscopisch onderzoek. Microscopie werd niet op alle stalen uitgevoerd omwille van een te kleine hoeveelheid staal. Het vierde luik van de tabel bevat gegevens die teruggevonden werden in het dossier van de patiënt. Uit de analyse blijkt dat er over een periode van 15 maanden, 5 stalen positief bevonden werden voor *Acanthamoeba* cultuur (oranje aangeduid in attachment I). Twee van die stalen toonden eveneens een positief resultaat op microscopie, de drie andere stalen gaven een negatief resultaat voor het rechtstreeks microscopisch onderzoek. Bij stalen die negatief waren voor *Acanthamoeba* cultuur, werd vier maal een schimmel gekweekt (groen aangeduid in attachment I) en acht maal werden bacteriën gevonden (paars aangeduid in attachment I).

2.1 Voordelen van PCR ten opzichte van microscopie en cultuur

- Verkorte antwoordtijd?

Bij een positieve *Acanthamoeba* cultuur was het resultaat gemiddeld binnen 3 dagen na staalname gekend. (Attachment I) Om dus een snellere antwoordtijd te kunnen bieden, moet de PCR snel na aanvraag uitgevoerd kunnen worden. Echter, PCR reacties worden vanwege technische redenen bij voorkeur in batch uitgevoerd. Tabel II toont dat er gedurende een periode van 15 maanden gemiddeld 3 maal per maand een cultuur wordt aangevraagd voor *Acanthamoeba*. Zelfs wanneer de PCR zou gebeuren telkens deze aangevraagd wordt, is de verkorting van de antwoordtijd maximaal 2 tot 3 dagen. Gezien het verband tussen de prognose en het interval tussen de start van de symptomen en de behandeling, zou men kunnen veronderstellen dat dit

Tabel II: Frequentie aanvraag van *Acanthamoeba* cultuur.

Maand	Aantal aanvragen
jan/13	0
feb/13	0
mrt/13	4
apr/13	1
mei/13	6
jun/13	1
jul/13	3
aug/13	3
sep/13	3
okt/13	4
nov/13	4
dec/13	2
jan/14	3
feb/14	2
mrt/14	5
<i>gem.</i>	<i>2,73</i>
<i>95% C.I.</i>	<i>0,89</i>
<i>med.</i>	<i>3</i>

cruciale dagen zijn. Maar als dat vergeleken wordt met de tijd die erover gaat voordat patiënten hulp zoeken, soms meerdere weken, dan zijn die enkele dagen minder van belang. Bijgevolg is het aangeraden om bij een klinisch vermoeden van AK, stalen af te nemen voor diagnose en meteen een behandeling op te starten.

- Hogere sensitiviteit?

Zoals eerder gemeld, is de gevoeligheid van microscopie en/of cultuur ongeveer 50% (Tabel 3). De studie van Yera *et al.* (2006) concludeerde dat microscopie en cultuur minder gevoelig zijn dan PCR. Echter, de methodes die zij gebruikten voor microscopie en cultuur verschillen duidelijk van de protocols gebruikt in UZ Leuven. Bovendien was de PCR methode een gel-based methode, en gaat onze voorkeur uit naar een qPCR methode omwille van praktische overwegingen. Maubon *et al.* (2012) vergeleken een qPCR methode met microscopie en cultuur, en stelden eveneens een verbeterde gevoeligheid van de qPCR vast. Dit besluit was echter gebaseerd op een studiepopulatie van 21 slechts patiënten. De Rivière en Qvarnstrom qPCR methodes werden geëvalueerd met microscopie en/of cultuur als referentiemethode en er kon geen besluit gevormd worden over een verbeterde gevoeligheid. Zowel Khairnar *et al.* 2011 als Thompson *et al.* 2008 beschouwden een positieve qPCR reactie gecombineerd met een negatief resultaat voor microscopie en/of cultuur als vals positief voor de qPCR. Er werd niet in de publicaties vermeld of de finale diagnose bij deze vals positieve qPCR resultaten AK was. Hierdoor kon niet worden aangetoond dat de sensitiviteit van qPCR beter is dan die van microscopie en/of cultuur. Wel zou er verondersteld kunnen worden dat, wanneer de gel-based Nelson-PCR (Yera *et al.* 2006) gevoeliger is dan microscopie en cultuur, de qPCR methodes dit ook zullen zijn. Aangezien de vergelijking van Khairnar *et al.* (2011) toonde dat de qPCR methodes een hogere gevoeligheid hadden dan de gel-based methodes (Tabel 6). De bevindingen van Maubon *et al.* (2012) vormen een bijkomend argument voor deze veronderstelling, al kan er geen eenduidig besluit genomen worden uit de gepubliceerde studies.

2.2 Voordelen van microscopie en cultuur ten opzichte van PCR

Microscopie en cultuur laten toe om ook andere micro-organismen waar te nemen of te isoleren, zoals bacteriën die de meest frequente oorzaak zijn van contactlens gerelateerde keratitis, en fungi. Indien een moleculaire methode geïmplementeerd zou worden, moet die steeds gecombineerd worden met microscopie en cultuur. Er moet dus voldoende staal afgenomen kunnen worden om alle drie de analyses uit te voeren. Dit is echter niet altijd mogelijk.

3 **Besluit**

Moleculaire diagnostiek is een gevoelige methode die nuttig kan zijn als aanvulling bij het stellen van de diagnose van AK, niet zozeer omwille van een belangrijke inkorting van de antwoordtijd maar eerder voor een verbetering van de gevoeligheid. Echter, de verbeterde gevoeligheid van een qPCR methode in verhouding tot microscopie en cultuur werd niet eenduidig aangetoond. Bij het invoeren van een moleculaire methode voor de diagnose van AK dient ook in overweging genomen te worden dat er voldoende staal afgenomen moet worden om zowel rechtstreeks microscopisch onderzoek, cultuur als qPCR te kunnen uitvoeren.

To DO/ACTIONS

- 1) Vanwege het lage aantal aanvragen voor *Acanthamoeba* cultuur zal nagegaan worden of er vraag is vanuit andere ziekenhuizen of laboratoria naar moleculaire techniek om de diagnose van AK te stellen.
- 2) Op basis van die analyse zal geëvalueerd worden welke primer-probe combinaties het best kunnen presteren in een real-time qPCR methode.

ATTACHMENTS
Attachment I

N°	Staaltype	Cultuur <i>Acanthamoeba</i>		Andere cultuur		Microscopie		Kliniek	
		Resultaat	TAT (dagen)	Resultaat	TAT (dagen)	Resultaat	TAT (dagen)	DD	Klinische info
1	contactlens contactvloeistof	neg	5	HSV:neg	9	neg			
2	NS	neg	6	bact: neg	3	neg	11		
3	NS	neg	6						
4	NS	neg	6	fun: pos	2	fungi	11	<i>Fusarium proliferatum</i>	ulcus ged. +/- 1 mnd.
5	NS	pos	3	bact: neg	2	pos	0	AK	(sinds 01/07/2012 last OS, 26/07/2012 UZ Gent = <i>Acanthamoeba</i>)
6	contactlens contactvloeistof	neg	6						
7	NS	neg	5			neg	1		
8	NS	pos	3			neg	1	AK	verwijzing keratitis sinds 2 mnd.
9	NS	neg	6	bact: pos	2			<i>S. marcescens</i>	
10	NS	neg	6	fun: pos				<i>Schizophyllum comune</i>	
11	NS	neg	6	HSV:neg	1	neg	1		
12	NS	neg	6	bact:neg	3				
13	NS	neg	5	bact: pos	2	neg	4	<i>S. warneri</i>	
14	contactlens	neg	4	bact: pos	2			<i>S. pneumoniae</i> en <i>S. epidermidis</i>	
15	NS	neg	7	bact: pos	2			<i>P. aeruginosa</i>	
16	contactlens	neg	7	bact: pos	2			<i>P. aeruginosa</i>	
17	NS	neg	5			neg			3 maanden cornea abces
18	NS	neg	6	bact: pos	3			<i>P. aeruginosa</i>	
19	NS	neg	6						
20	NS	neg	6	bact: neg	3				bacteriële conjunctivitis met infiltraten in cornea
21	NS	neg	6	bact: neg	3				
22	NS	neg	5			neg	1		
23	NS	neg	6	bact: pos	1			<i>E. coli</i> en <i>S. maltophilia</i> gekweekt uit lenzenvocht	
24	NS	neg	5	bact: pos	1			<i>S. epidermidis</i>	
25	NS	neg	16			neg	8		
26	NS	neg	7						
27	NS	pos	2	fun: pos	10	neg	7	AK+Acremonium	(sinds 6 weken last, klachten verminderen niet met AB of antivirale middelen)
28	NS	neg	5						
29	NS	pos	2			neg	8	AK	

N°	Staaltype	Cultuur <i>Acanthamoeba</i>		Andere cultuur		Microscopie		Kliniek	
		Resultaat	TAT (dagen)	Resultaat	TAT (dagen)	Resultaat	TAT (dagen)	DD	Klinische info
30	NS	neg	6			neg	10		
31	intraoculaire contactlens	neg	5						
32	NS	neg	7						
33	NS	neg	6						
34	NS	neg	6						
35	NS	neg	6						
36	NS	pos	4			pos	4	AK	
37	contactlens li	neg	5	fun: pos	4	pos	1	<i>Fusarium spp.</i>	
38	NS	neg	6	bact: pos	2			<i>S. liquefaciens</i>	
39	OS links	neg	5						
40	NS	neg	5						
41	NS	neg	6						

Oranje: *Acanthamoeba*

NS: not specified

Groen: *fungi*

pos: positive

Paars: bacteriën

neg: negative