

**Diplomarbeit**

**Excimerlaser Applikation mit Mitomycin C zur  
Therapie der Akanthamöbenkeratitis: eine retrospektive  
Studie**

eingereicht von

**Klemens Kaiser**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an

**Universitäts-Augenklinik Graz**

unter der Anleitung von

**Univ.-Doz. Dr. med. univ. Navid Ardjomand**

Zürich, am 01.07.2021

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Zürich, am 01.07.2021*

*Klemens Kaiser eh*

## Danksagungen

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen auf unterschiedlichste Weise äußerst positiv beigetragen. Mit diesen Zeilen möchte ich meine Dankbarkeit zum Ausdruck bringen.

Zuallererst möchte ich vor allem meinen Eltern, aber auch meinem Bruder und meiner Großmutter danken, da ohne ihrer sehr vielseitigen und großzügigen Unterstützung die Absolvierung des Studiums und damit meines Lebensraums gar nicht möglich gewesen wäre. Auch meine Freundin hat einen großen Beitrag an der wundervollen Studienzeit beigetragen.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinem Diplomarbeitsbetreuer Univ. Doz. Dr. Navid Ardjomand aussprechen, der stets zu jedem Wochentag und nahezu jeder Uhrzeit für mich erreichbar war. Danke für die Themenvielfalt, die mir zur Auswahl stand, für das Vertrauen mich schlussendlich bei diesem äußerst spannenden Thema zu betreuen und mir die Möglichkeit zu geben an der Universitäts-Augenklinik des LKH Graz meine Diplomarbeit zu verfassen. Als fachliches Vorbild mit großer wissenschaftlicher und klinischer Kompetenz hat er mich auch abseits der Diplomarbeit mit wertvollen Ratschlägen gefördert.

# Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN.....	II
INHALTSVERZEICHNIS .....	III
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN .....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ZUSAMMENFASSUNG.....	VII
ABSTRACT .....	IX
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>11</b>
1.1 AUFBAU DER HORNHAUT .....	11
1.1.1 Epithel .....	12
1.1.2 Bowman-Lamelle (Lamina limitans anterior).....	13
1.1.3 Stroma.....	13
1.1.4 Descemet-Membran (Lamina limitans posterior) .....	14
1.1.5 Endothel .....	14
1.2 AKANTHAMÖBENKERATITIS.....	15
1.2.1 Vorkommen.....	15
1.2.2 Epidemiologie.....	15
1.2.3 Diagnostik .....	16
1.2.4 Pathogenese .....	19
1.2.5 Die therapeutischen Möglichkeiten der Akanthamöbenkeratitis .....	23
1.3 GRUNDLAGEN VON MITOMYCIN C .....	25
1.3.1 Die Bedeutung von Mitomycin C bei refraktivchirurgischen Eingriffen.....	26
1.3.2 Aktuelle Therapieempfehlung von Mitomycin C .....	28
1.4 DIE GRUNDPRINZIPIEN DER PHOTOTHERAPEUTISCHEN KERATEKTOMIE MIT DEM EXCIMERLASER.....	29
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV .....	31
2.2 DATENERHEBUNG .....	31
2.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	31
2.4 FALLVORSTELLUNGEN .....	32
2.4.1 Patient 1.....	32
2.4.2 Patientin 2.....	35
2.4.3 Patient 3.....	37
2.4.4 Patient 4.....	38
2.4.5 Patient 5.....	40
2.4.6 Patientin 6.....	44
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>49</b>
4.1 MÖGLICHE HYPOTHESEN.....	54
4.2 LIMITATIONEN.....	56
<b>5 KONKLUSION.....</b>	<b>57</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>58</b>

## Glossar und Abkürzungen

Log MAR.....	<i>Logarithmus des minimalen Auflösungswinkels</i>
AK.....	<i>Akanthamöbenkeratitis</i>
KL.....	<i>Kontaktlinse</i>
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i>
ATP.....	<i>Adenosintriphosphat</i>
ADP.....	<i>Adenosindiphosphat</i>
PHMB.....	<i>Polyhexamethylenbiguanid</i>
PKP.....	<i>penetrierende Keratoplastik</i>
PTK.....	<i>Phototherapeutische Keratektomie</i>
BCVA.....	<i>best corrected visual acuity (deutsch: Sehschärfe mit bestmöglicher Korrektur)</i>
V.s.c.....	<i>Visus sine correctione (Sehschärfe ohne Korrektur, „Rohvisus“)</i>
AS.....	<i>Augensalbe</i>
AT.....	<i>Augentropfen</i>
Bzw.....	<i>beziehungsweise</i>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die schematische Darstellung und Beschreibung des Auges [67].....	11
Abbildung 2: Interstitielle Herpes-simplex Keratitis mit Ödem und Infiltraten im Stroma.....	16
Abbildung 3: Stromale Keratitis durch eine Reinfektion von Herpes-simplex Virus mit Stromalen Ödem und Neovaskularisation. ....	16
Abbildung 4: Periodic acid-Schiff (PAS) Färbung der Cornea mit Akanthamöben-Zysten im Stroma. ....	17
Abbildung 5: PAS Färbung mit Zysten im cornealen Stroma.....	17
Abbildung 6: Zytologisches Bild einer mit Lactophenolblau (engl. lactophenol cotton blue) angefärbten Akanthamöben-Zyste (Pfeil). ....	18
Abbildung 7: Prä-PTK und post-PTK Fotografien an der Spaltlampe von diesem Patient.....	34
Abbildung 8: Ein Bild der infizierten Kornea in der Spaltlampenuntersuchung im Juni 2014. In der unteren Hälfte eine bogenförmige Epithelschlussleiste mit kleinen subepithelialen Trübungen, sowie kleine Infiltrate sichtbar. ....	35
Abbildung 9: Bild der betroffenen Hornhaut 4 Tage nach Durchführung der PTK.....	35
Abbildung 10: 10 Wochen nach erfolgter PTK.....	36
Abbildung 11: 3 Wochen nach dem Eingriff ist die Hornhaut noch etwas trüb. ....	36
Abbildung 12: Foto der Spaltlampenuntersuchung vom 20. August 2014 .....	37
Abbildung 13: Dieses Foto zeigt die Hornhaut des Patienten am 23. Juli 2014, an dem eine Keratitis festgestellt wurde .....	37
Abbildung 14: 4 Wochen nach der PTK zeigte sich dieses Bild in der Spaltlampenuntersuchung.....	37
Abbildung 15: präoperatives Foto des betroffenen Auges zwei Monate vor PTK:.....	39
Abbildung 16: Foto in der Spaltlampenuntersuchung präoperativ.....	41
Abbildung 17: Foto der Kornea 2 Wochen nach erfolgter PTK. Das Hornhautepithel zentral noch minimal offen.....	42
Abbildung 18: Foto der Hornhaut in der Spaltlampenuntersuchung nach 12 Monaten. Feine Narbe in der zentralen Hornhaut.....	43
Abbildung 19: 3 Monate nach dem phototherapeutischen Eingriff.....	43
Abbildung 20: Präoperativ zeigte sich in der Spaltlampenuntersuchung unter anderem eine nicht anfärbbare, kleine Trübung, ein diffuses Stromaödem und eine Erosion nasal, die vom Abkratzabstrich stammt.....	45
Abbildung 21: In der konfokalen Mikroskopie sind Akanthamöben-Zysten (roter Pfeil) zu sehen.....	45
Abbildung 22: Postoperatives Bild der Spaltlampenuntersuchung 6 Monate nach der PTK.....	46

Abbildung 1:

[67] Von Talos, colorized by Jakov - copied from German Wikipedia, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3321021>

Abbildung 2 – 23:

Dankend zu Verfügung gestellt von Univ.- Doz. Dr. med. univ. Navid Ardjomand und der Universitäts-Augenklinik des LKH-Univ. Klinikum Graz.

## **Tabellenverzeichnis**

*Tabelle 1 Die wichtigsten Charakteristika der beschriebenen sechs Augen, bei denen eine therapieresistente Akanthamöbenkeratitis vorlag.*

48

# Zusammenfassung

## Einleitung

Akanthamöben sind einer der schwerwiegendsten Ursachen einer Hornhautentzündung (Keratitis), die nicht selten zu einer Erblindung des betroffenen Auges führen, besonders wenn die Diagnose spät erfolgt. Die topische Therapie ist oft nicht erfolgreich, weshalb die Patientinnen und Patienten eine Hornhauttransplantation als Behandlung benötigen. In diesem Fallbericht werden sechs Fälle von sechs Patientinnen und Patienten mit diagnostizierter Akanthamöbenkeratitis präsentiert, bei denen ein Ansprechen auf das topische Therapieregime ausblieb und folglich erfolgreich mit einer phototherapeutischen Keratektomie (PTK) und der Applikation von Mitomycin C (MMC) 0,02% behandelt wurden.

## Methoden

Sechs Augen von sechs Patientinnen und Patienten mit diagnostizierter Akanthamöbenkeratitis (AK) und erfolgloser topischer Therapie (Propamidin und Polyhexamethylenbiguanid (PHMB)) für mindestens drei Monate wurden mittels PTK nach Entfernen des Epithels und der Applikation von MMC 0,02% (30 – 90 Sekunden) zwischen 2009 und 2018 behandelt. Die Behandlung wurde bei allen Fällen von einem Chirurgen durchgeführt. Eine aktive Akanthamöbenkeratitis wurde bei allen sechs Patientinnen und Patienten am Tag der Durchführung der PTK mittels Biopsie, Kultur oder konfokale Mikroskopie nachgewiesen. In der konfokalen Mikroskopie konnten Zysten bis zu einer Tiefe von 240 µm des Hornhautstromas detektiert werden. Nach der PTK wurden alle Augen mit einer therapeutischen Kontaktlinse bis zum Verschluss des Hornhautepithels versorgt. Die topische Therapie mit PHMB, Dexamethason und befeuchtenden Augentropfen wurde bis zu sechs Wochen fortgeführt und dann gestoppt. Die postoperative Nachbeobachtungszeit betrug sechs Monate bis neun Jahre.

## Ergebnisse

In allen sechs beschriebenen Fällen konnten die Akanthamöben-Zysten erfolgreich eradiziert werden. Darüber hinaus zeigte sich eine Verbesserung der Sehleistung in allen sechs Fällen. In einem Fall entwickelte sich ein dichter Grauer Star (Katarakt) während der Behandlung. Im Zuge der postoperativen histologischen Untersuchungen konnten in allen Fällen keine Akanthamöben-Zysten mehr nachgewiesen werden. Der beste korrigierte Visus

sechs Monate postoperativ lag zwischen 0.5 bis 0.1 (log MAR). In keinem der sechs Fälle konnte eine Rekurrenz der Akanthamöbenkeratitis beobachtet werden.

### **Schlussfolgerung**

Diese Fallpräsentation zeigt deutlich, dass die Kombination von PTK und MMC 0,02% ein neuer und erfolgsversprechender Behandlungsansatz in der Therapie der therapieresistenten AK sein könnte. Auch in Fällen, bei denen die Akanthamöben-Zysten sehr tief im Stroma (bis 240 µm) detektiert wurden, erreichte man mit diesem Behandlungskonzept eine Heilung der AK. Es erwies sich als hilfreich vor der Durchführung der PTK eine konfokale Mikroskopie durchzuführen, um die Tiefe der Zysten im Stroma zu detektieren und auch den Therapieerfolg besser evaluieren zu können.

# **Abstract**

## **Purpose**

Acanthamoeba is one of the most severe causes of keratitis and a sight-threatening disease, especially if late diagnosis. Topical treatment is often not successful and therefore corneal transplantation is the required treatment on numerous occasions. This case report describes the history of six patients with acanthamoeba keratitis resistant to topical treatment, who were successfully treated with phototherapeutic keratectomy (PTK) and mitomycin 0.02% application.

## **Methods**

Six patients (six eyes) with diagnosed acanthamoeba keratitis and unsuccessful topical treatment for three months (Propamidine isetionate and Polyhexamethylenbiguanid (PHMB)) underwent PTK after epithelium removal with topical mitomycin 0.02% (30 – 90 seconds) application between 2009 and 2018. In all cases the procedure was done by the same surgeon. Active acanthamoeba keratitis was diagnosed in all patients on the day of PTK by corneal scrape and culture or confocal microscopy. Confocal microscopy showed the cysts at a depth of up to 240µm in the mid stroma. A therapeutic contact lens was always inserted until epithelial closure. Topical treatment with PHMB, topical lubrication and dexamethasone TID was continued for up to six weeks and then stopped. Postoperative follow up time was six months to nine years.

## **Results**

Acanthamoeba cysts could be eradicated in all six cases. Visual acuity increased in all patients. One patient developed a dense cataract during the treatment. Histology of the corneal tissue did not show any acanthamoeba cysts in the corneal tissue. BSCVA was 0.5 to 0.1 (log MAR) in all patients six months after PTK. None of them developed a recurrence during the entire follow up period of up to nine years.

## **Conclusion**

The combination of PTK with mitomycin 0.02% can be a successful approach for the treatment of acanthamoeba keratitis in patients who are resistant to topical treatment. This protocol seems also to be successful in corneas with cysts at the depth of up to 240µm.

However, confocal microscopy should be performed before laser application to measure the depth of the cysts and to control the post-operative success of the treatment.

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Hornhaut

Die Hornhaut (Kornea) als transparentes, avaskuläres Gewebe der vorderen Augenhaut fungiert mitunter als Primärbarriere des Auges gegenüber infektiösen Erregern sowie Fremdkörpern und ist als „Frontlinse“ von herausragender Bedeutung für das Sehen. In Symbiose mit der Tränenflüssigkeit bildet die Kornea eine optimale, glatte Oberfläche für die Lichtbrechung und trägt mit einer Brechkraft von 43 Dioptrien (Dpt) zu zwei Drittel der Gesamtbrechkraft des Auges bei. Ihre Transparenz ist ein Resultat aus vielen Faktoren, einschließlich des komplexen anatomischen Aufbaus und der Physiologie der Zellen. [1,2]

Die Kornea besitzt eine ellipsoid-sphärische Form, im äußeren Bereich durch eine seichte Randfurche (Limbus corneae) zur schwächer gekrümmten Lederhaut (Sklera) abgegrenzt und beträgt beim Erwachsenen annäherungsweise 11,5 mm (10 – 13 mm) im horizontalen Durchmesser und ist in der Vertikalen circa einen Millimeter kleiner. Der Krümmungsradius beträgt 7 – 8 mm. Im Zentrum beträgt die Dicke der Hornhaut 0,52 mm und zur Randfurche hin 0,67 mm. [1,3]

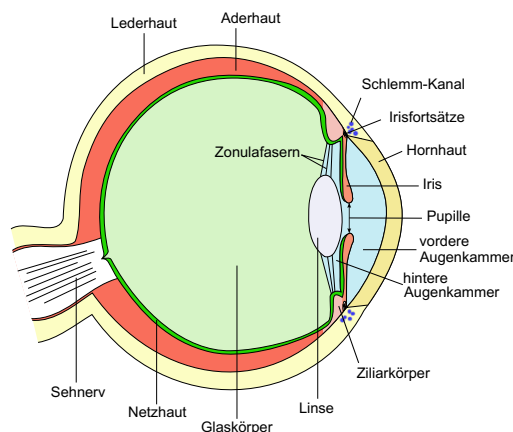


Abbildung 1 Die schematische Darstellung und Beschreibung des Auges [67]

Wie auch die Linse, die Lederhaut und der Glaskörper zählt die zellarme, normalerweise gefäßfreie Hornhaut zu den bradytrophen Geweben. Die Ernährung von Aminosäuren und Glukose geschieht durch die Diffusion aus dem Randschlingennetz, Stoff- und Ionenaustausch aus dem Kammerwasser und dem Tränenfilm. Auf dem gleichen Weg geschieht auch die Entfernung von Stoffwechselprodukten. Neben der nutritiven Funktion wirkt der Tränenfilm durch das Ferment Lysozym gegen Infektionen und sichert, wie oben bereits erwähnt, die glatte Oberfläche. Zudem liefert sie Wachstums- und immunologische

Faktoren, die ausschlaggebend für die epitheliale Gesundheit, Proliferation und Reparatur sind. [3,4]

Die Hornhaut zählt zu den stärksten innervierten und sensitivsten Geweben des Körpers. Vom *Nervus nasociliares*, einem Ast des *Nervus ophthalmicus*, welcher wiederum vom *Nervus trigeminus* (5. Hirnnerven) stammt, gelangen Nervenfasern in die oberflächliche Hornhaut, von wo sie radiär in das Stroma eindringen und sich geflechtartig ausbreiten. [14]

Eingeteilt wird die humane Hornhaut in fünf Schichten: Epithel, Bowman-Lamelle, Hornhautstroma, Descemet-Membran und Hornhautendothel.

### **1.1.1 Epithel**

Die Oberfläche der Kornea, das *Epithelium corneae*, bildet die erste Barriere gegen externe Einflussfaktoren. Diese ist aus einem vier- bis sechsschichtigen, unverhornten Plattenepithel (40 µm bis 50 µm) aufgebaut, dessen basale Zellen, auch als die mittleren bzw. Flügelzellen bezeichnet, sich säulenartig vermehrt horizontal ausbreiten und die oberen Zellen stärker abgeflacht erscheinen. Korneale Epithelzellen haben durch im Vorfeld bestimmte Rückbildungen, Apoptosen (programmierter Zelltod) und Abschilferungen eine durchschnittliche Lebenszeit von 7 bis 10 Tagen. Diese Prozesse führen zu einer kompletten wöchentlichen Neubildung, wobei die oberflächlichen, abgestoßenen Zellen durch Zellen der tieferen Epithelschicht ersetzt werden. [2,3,4,7]

Die oberflächlichsten Epithelzellen bilden untereinander Komplexe aus sogenannten tight junctions, die verhindern, dass Tränenflüssigkeit in den Zwischenzellraum gelangt. Diese Barriere schützt außerdem vor dem Durchtritt von Toxinen und Mikroorganismen in tiefere Hornhautschichten. [2]

Die tiefste Zellschicht des Hornhautepithels besteht aus einer Lage von säulenförmigen Basalzellen, die fähig sind sich durch Mitosen zu teilen und gleichzeitig die Vorläufer von Epithelzellen der darüber liegenden Epithelschichten darstellen. Der starke Zusammenhalt des Epithels mit den darunter liegenden Hornhautschichten resultiert aus einem System von Hemidesmosomen, welche die Basalzellen mit der Basalmembran verbinden. Epitheliale Stammzellen, welche ebenfalls eine wichtige Quelle neuer kornealer Epithelzellen sind,

finden sich in den Vogt-Palisaden in der limbalen Basalschicht. Beschädigte oder zerstörte Limbusstammzellen können zu chronischen Epitheldefekten und zur „Konjunktivalisierung“ (Auftreten von Becherzellen und Gefäßen, epitheliale Instabilität) führen. Somit sind diese Stammzellen essentiell für den Erhalt der physiologischen Barriere durch z.B. eine rasche Regeneration im Verletzungsfall und dem Schutz vor dem Überwachsen der Konjunktiva auf die Kornea. Wenn diese Zellen in Richtung zentraler Hornhaut wandern, differenzieren sie sich zu „TA-cells“ (transient amplifying cells) und Basalzellen. [2,5,6,8]

Die epitheliale Basalmembran ist annäherungsweise 0,05 µm dünn und aus Kollagen Typ IV und Laminin aufgebaut. Diese Bestandteile werden von den Basalzellen produziert. [2]

### **1.1.2 Bowman-Lamelle (Lamina limitans anterior)**

Angrenzend an die Basalmembran des kornealen Epithels liegt die Bowman-Lamelle vor dem Hornhautstroma. Diese, aus Kollagenfasern aufgebaute, azelluläre Schicht (etwa 15 µm dünn) ist sehr widerstandsfähig und hilft der Hornhaut ihre Form aufrechtzuhalten. Eine Verletzung der Bowman-Lamelle ist nicht regenerationsfähig und kann zur Bildung einer Narbe führen. [2,8]

### **1.1.3 Stroma**

Das Stroma nimmt rund 80 – 85 % der Hornhautdicke ein und unterscheidet sich von anderen kollagenen Strukturen durch seine Transparenz, die durch eine präzise Organisation aus stromalen Fasern und Extrazellulärmatrix hervorgeht.

Kollagene Fasern sind zu Fibrillen organisiert und zu parallel angeordneten Schichten oder Lamellen gepackt. Das periphere Stroma der Kornea ist etwas dicker als das zentrale Segment.

Stromale Fibrillen bestehen aus Typ I Kollagen, das in einem heterodimeren Komplex mit Typ V Kollagen angeordnet ist, um den spezifischen und engen Durchmesser zu erzielen. [9] Diese Komplexe sind umgeben von spezialisiertem Proteoglykanen, bestehend aus Keratansulfat und Chondroitinsulfat, in denen modifizierte Fibroblasten, sog. Keratozyten, eingebettet verteilt liegen, die den Hauptzelltyp des Stromas ausmachen.

Keratozyten sind zur Synthese von Molekülen befähigt, die eine wichtige Rolle in der Stromalen Homöostase haben. Die meisten dieser Zellen befinden sich im vorderen Teil des Hornhautstromas. [2,3,8]

#### **1.1.4 Descemet-Membran (Lamina limitans posterior)**

Unter der Descemet-Membran versteht man eine dünne Schicht aus Kollagenfasern, die zwischen Stroma und Hornhautendothel liegt und sich in eine vordere, geordnete Zone und eine hintere, ungeordnete Zone gliedert. [8] Die Dicke der Membran reicht von etwa 3  $\mu\text{m}$  bei Geburt bis über 10  $\mu\text{m}$  im Alter. [10]

#### **1.1.5 Endothel**

Die Endothelschicht der Kornea sorgt für die Transparenz der Hornhaut durch die Erhaltung der Dehydration, wobei Flüssigkeit aus dem Stroma herausgepumpt wird. Das intakte humane Endothel ist einschichtig und erscheint, durch die polygonal geformten Zellen, wie ein Bienenwaben-ähnliches Mosaik, wenn es von der posterioren Seite betrachtet wird.

Die Dichte an Endothelzellen verändert sich kontinuierlich im Laufe des Lebens. Von der zweiten bis zur achten Lebensdekade sinkt die Endotheldichte von 3000 – 4000 Zellen/  $\text{mm}^2$  auf etwa 2600 Zellen/  $\text{mm}^2$ . [12] In normalen Hornhäuten sinkt die Endotheldichte durchschnittlich um 0,6% pro Jahr, wobei benachbarte Zellen an Größe zunehmen, um den Raum verlorener Endothelzellen zu füllen. [8,11]

Durch die Aktivität endothelialer Zellen wird der Wasseranteil des Stromas bei etwa 78% gehalten. [13] Diese Dehydration geschieht durch eine Pumpfunktion, wodurch die stromale Flüssigkeit entlang des osmotischen Gradienten aus dem Hornhautstroma austritt. Energieverbrauchend ist der passive Flüssigkeitsstrom per se nicht, jedoch wird Energie für die Herstellung des dafür benötigten osmotischen Gradienten aufgewendet, wobei vor allem die membrangebundene  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ -ATPase und die intrazelluläre Carboanhydrase für diese Transportvorgänge von Bedeutung sind. [2]

Endothelzellen besitzen keine mitotische Aktivität in vivo, jedoch werden Menschen mit einer signifikanten Reserve dieser Zellen geboren. Wie bereits oben erwähnt ist die Zelldichte bei der Geburt etwa 3500 Zellen/  $\text{mm}^2$  und reduziert sich um ungefähr 0,6% pro

Jahr. [11] Werte unter 500 Zellen/ mm<sup>2</sup> stehen in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Hornhautödems und einer Hornhauttrübung. [8]

## **1.2 Akanthamöbenkeratitis**

Die Akanthamöbenkeratitis (AK) ist eine schwere, potentiell erblindende Infektion des Auges, die durch verschiedene Arten beziehungsweise Stämme der Gattung *Acanthamoeba* (vorwiegend Genotyp T4) verursacht wird. [36] Obwohl als Hauptrisikofaktor das Tragen von Kontaktlinsen (KL) gilt, sind Infektionen auch bei Nicht-Kontaktlinsenträgerinnen und Träger möglich. Die AK präsentiert sich üblicherweise, aber nicht immer, mit massiven Schmerzen, Photophobie, Epiphora, epithelialen Defekten, Lidödemen und ringartigen, stromalen Infiltraten. Folgen einer nicht adäquaten und aggressiven Therapie reichen bis zum Sehverlust des betroffenen Auges. [15-23] Die korrekte Diagnose der AK ist sehr anspruchsvoll – die Therapie bislang sehr ineffizient, da die Akanthamöben in der Zysten-Form nahezu unzerstörbar sind. [23]

### **1.2.1 Vorkommen**

Die Akanthamöben sind frei lebende, ubiquitär vorkommende Protozoen, die häufig Erde, Schlamm, frisches und brackiges Gewässer und Biofilme (beispielsweise in Wasserversorgungssystemen) bewohnen und somit in unmittelbarer Umgebung von Menschen vorzufinden sind. Nur unter besonderen Umständen werden die Erreger der AK pathogen.

Akanthamöben haben einen biphasischen Lebenszyklus, wobei sich die Amöben im sogenannten Trophozitenstadium vermehren, stoffwechselaktiv werden und durch Acanthopodien beweglich sind. Durch Umweltstressoren begeben sie sich in die Zysten-Form mit einer massiven, doppelten Zellwand. [8,23]

### **1.2.2 Epidemiologie**

Die ersten Publikationen der AK lassen sich in der Literatur in den 1970er Jahren finden. [120] Durch die wachsende Verwendung von KL stieg die Inzidenz auch allmählich in den darauffolgenden Dekaden an. In den 90er Jahren wurde die Inzidenz in einer Publikation

von Seal DV [123] mit 1/30.000 KL-Trägerinnen und Träger beschrieben. Heutzutage werden in etwa 5% der KL-assoziierten Keratitiden durch Akanthamoeben verursacht. [124-126]

### 1.2.3 Diagnostik

Bei jedem Hornhauttrauma mit potentieller Kontamination mit Schmutz und Wasser, sowie bei KL Trägerinnen und Träger ist es besonders wichtig eine Infektion einer AK zu berücksichtigen. [23-27] Da im Falle einer verzögerten Diagnose die Amöben tief in die stromale Schicht der Hornhaut wandern und damit die Therapie erschwert wird, ist eine frühe Erkennung der AK maßgeblich mit einem besseren Ausgang der Erkrankung vergesellschaftet. Die AK ist normalerweise einseitig und ein langsamer infektiöser Prozess, der sich anfangs als diffuse, oberflächliche Keratopathie manifestiert. Später zeigen sich multifokale Infiltrate, die fast immer im Stroma beobachtet werden. [23]

Differenzialdiagnostisch erwähnenswert sind im frühen Stadium vor allem die *Herpes simplex keratitis* (Abb. 2 und Abb. 3), im fortgeschrittenen Stadium besonders die *fungale Keratitis*, oder ein *korneales Ulcus*, die dem klinischen Bild einer AK sehr stark ähneln können. [23]

Die für die AK typischen ringartigen, stromalen Infiltrate, die von Tu et al. [28] als schwerwiegendster Befund in der Spaltlampenuntersuchung beschrieben werden, treten bei etwa 50% der Patienten auf. Typischerweise suchen KL Trägerinnen und Träger erst verspätet Hilfe auf, da sie feine Irritationen im Auge gewohnt sind und diese nicht als eine Infektion am Auge auffassen. [23]

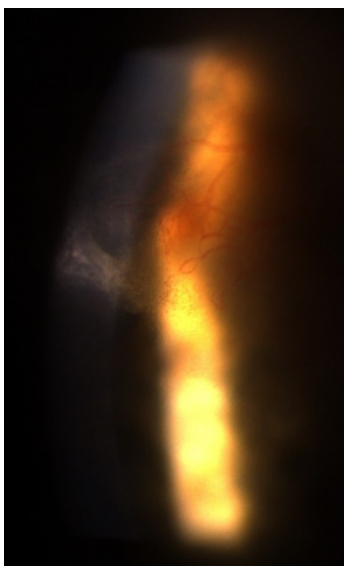


Abbildung 3: stromale Keratitis durch eine Reinfektion von Herpes-simplex Virus mit stromalen Ödem und Neovaskularisation.

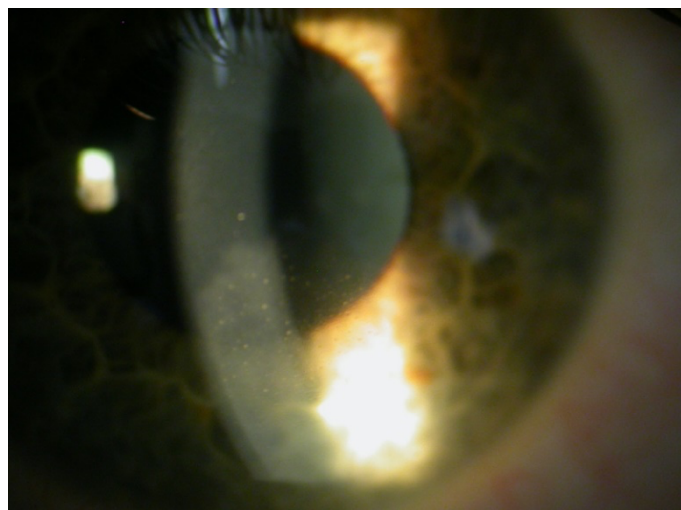


Abbildung 2: Interstitielle Herpes-simplex Keratitis mit Ödem und Infiltraten im Stroma.

Die vorläufige Diagnose kann mittels konfokaler in-vivo-Mikroskopie, in der die Akanthamöben-Zysten als hyperreflektive, sphärische Strukturen erscheinen, die normalerweise durch ihre doppelte Wand gut definierbar sind, gestellt werden (Abb. 21). Die Trophozoiten hingegen können von Leukozyten und den Zellkernen der Keratozyten schwer differenziert werden. [23,29] Die zuverlässigste diagnostische Methode der AK ist jedoch der direkte Erregernachweis aus kornealen Biopsien. (Abb. 4 und Abb. 5)

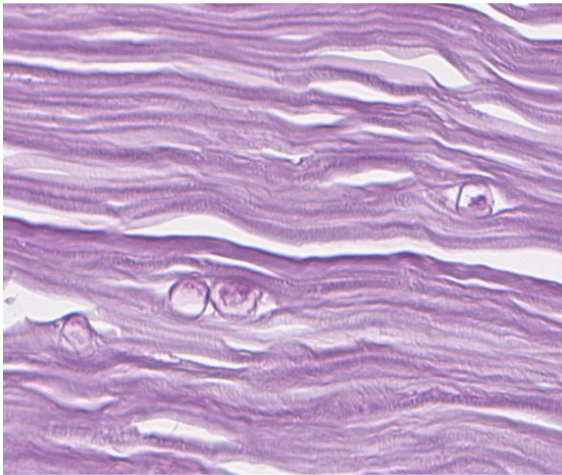


Abbildung 4: Periodic acid-Schiff (PAS) Färbung der Cornea mit Akanthamöben-Zysten im Stroma.

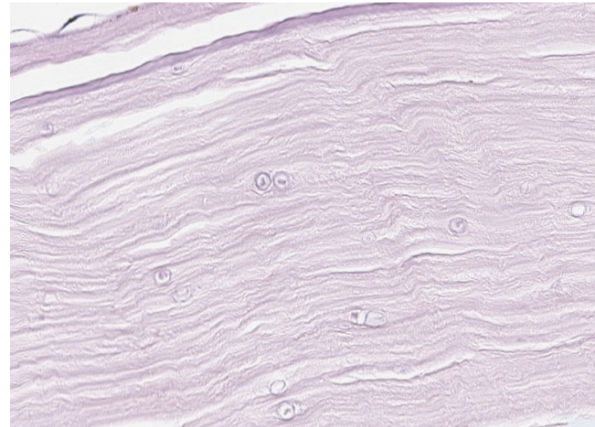


Abbildung 5: PAS Färbung mit Zysten im cornealen Stroma

Die Kultur (die Vermehrung beziehungsweise Anzucht von Mikroorganismen unter kontrollierten Bedingungen in einem umgebenden Nährmedium) ist nach wie vor der Goldstandard, jedoch etablieren sich vermehrt auf der PCR (engl. *polymerase chain reaction*; eine Methode, um die Erbsubstanz DNS in vitro zu vervielfältigen) basierende Techniken, die sich durch eine höhere Sensitivität auszeichnen. [23,30-33] Bereits durch direkte Mikroskopie ohne Färbemethoden lassen sich die dicht auftretenden Amöben in Biopsien ausgeprägter Fälle erkennen. [23] Zudem bei Patientinnen und Patienten, bei denen eine Vortherapie mit Antibiotika stattgefunden hat, ist die Dichte der Amöben sehr niedrig. Serologische Methoden haben bei der AK keinen diagnostischen Stellenwert, da spezifische Antikörper auch in gesunden Personen auftreten (bis etwa 50%). [35] Demnach ist ein Nachweis von Akanthamöben bei klinischer Beschwerdefreiheit meistens als irrelevant anzusehen. [23]

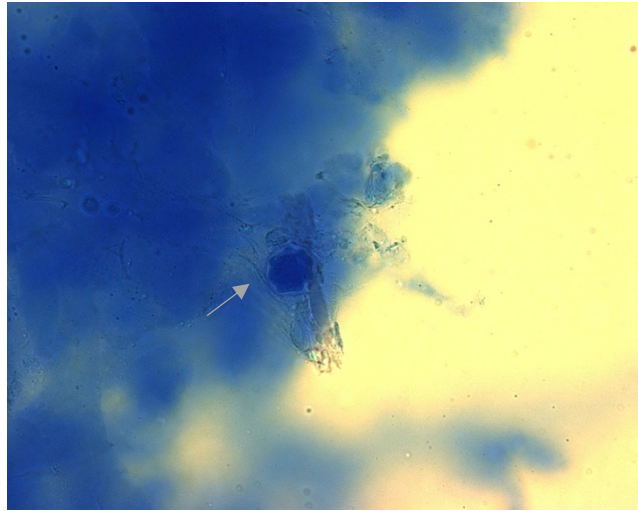


Abbildung 6: Zytologisches Bild einer mit Lactophenolblau (engl. lactophenol cotton blue) angefärbten Akanthamöben-Zyste (Pfeil).

Akanthamöben können, im Gegensatz zu anderen Amöben, sich im Gewebe in die Zystenform begeben. Das Überleben einer einzigen Zyste in der Hornhaut reicht aus, um eine Reinfektion hervorzurufen, weswegen der Krankheits- bzw. Therapieverlauf regelmäßig kontrolliert werden sollte. Hierfür empfiehlt es sich die aktive AK alle ein bis zwei Wochen, nach Symptombefreiheit monatlich für sechs Monate zu observieren. [23]

In den meisten Ländern treten Fälle der AK vor allem bei KL Trägerinnen und Träger auf, die durch strikte KL Hygiene vermieden werden könnte. Typischerweise gelangen über Leitungswasser oder Luft einzelne Amöben in den KL Behälter, wo sie sich rasch vermehren können, wenn eine sorgsame und regelmäßige Reinigung ausbleibt. Anschließend geraten die Amöben auf die KL und können so das Auge infizieren [36] Dadurch, dass die Akanthamöben besonders gut am hydrophilen Plastik der weichen KL haften und diese schwieriger zu reinigen sind als harte KL, sind Trägerinnen und Träger weicher Linsen stärker gefährdet. Darüber hinaus werden weiche KL länger in Verwendung gebracht als vorgeschrieben und auch eher von Personen verwendet, die die Linsen nur bedarfsweise verwenden, z.B. beim Sport, wodurch die KL Hygiene nicht selten vernachlässigt wird. Zur Prophylaxe der AK ist angezeigt die KL Behälter regelmäßig zu reinigen und anschließend Luft zu trocknen. Die Linsen sollten in einer zweckmäßigen Lösung gereinigt und aufbewahrt werden (am besten: 2-Schritt-Systeme), sowie Linsen und Behälter regelmäßig gewechselt werden. [23]

## 1.2.4 Pathogenese

Abseits des subtilen Problems der raschen und korrekten Diagnosestellung einer AK und der bislang noch ineffizienten medikamentösen Therapieoptionen, ist die Fähigkeit der Akanthamöben sich in die insistente Zysten-Form zu verwandeln, wodurch diese Parasiten gegen empfohlene Dosen antimikrobieller Chemotherapeutika resistent sind, zusätzlich erschwerend. Durch spezifische Adhäsine, der Produktion von Toxinen und der Fähigkeit Umwelt- und Immundefaktoren zu widerstehen, gelingt es diesem Pathogen eine Infektion hervorzurufen. [23]

### 1.2.4.1 Direkte Faktoren der Akanthamöben-Pathogenität

Die **Adhäsion** ist ein wichtiger Schritt in der Pathogenitätskaskade der AK. Durch die Fähigkeit der Adhäsion gelingt es den Akanthamöben biologische Barrieren zu überwinden und sekundäre Prozesse hervorzurufen. Einige Adhäsine konnten bereits identifiziert werden, einschließlich den Mannose-bindenden Proteinen und den Laminin-bindenden Proteinen. In einem chinesischen Hamstermodell zeigte sich beispielsweise ein besserer Behandlungserfolg der AK durch eine orale Immunisierung mit rekombinanten Mannose-bindenden Proteinen. [37,38] Die Bindung von Akanthamöben an Wirtszellen greift an dieser am intrazellulären Signalweg ein. [23] Es hat sich herausgestellt, dass die Parasiten durch die Adhäsion die Expression einer Vielzahl an Genen, die wichtig für den Zellzyklus sind, beispielsweise GADD5A und p130Rb, entscheidend regulieren. Dadurch gelingt es den Akanthamöben den Zellzyklus still zu legen. [39] Der Akanthamöben-vermittelte Wirtszelltod basiert auf der Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase. [40] Chusattayanond et al. [41] zeigten, dass die Apoptose der Wirtszelle durch die Akanthamöben Caspase-abhängig verläuft und durch die Überexpression von pro-apoptischen Proteinen im mitochondrialen Signalweg herbeigeführt wird, während Tripathi et al. [42] die Rolle der zytosolischen Phospholipase A2 $\alpha$  (cPLA2 $\alpha$ ) im Signalweg der Wirtszell-Apoptose demonstriert.

Die Adhäsion der Akanthamöben führt zu sekundären Ereignissen, wie etwa auch die Phagozytose oder die Sekretion von Toxinen. Die Fähigkeit der Akanthamöben sogenannte Amöbastome, eine Art „Saugnäpfe“ an der Oberfläche des Mikroorganismus, während der Inkubation der Wirtszelle auszubilden, weisen auf ihre Bedeutung in der Pathogenese der Akanthamöben hin. [43] Innerhalb von 40 Sekunden werden Partikel, umgeben von

Pseudopodien, in das Zytoplasma gebracht und als Phagosom in die Plasmaströmung freigelassen. [23] Der oxidative Metabolismus in Akanthamoeben hat eine auffallende Ähnlichkeit zum oxidativen Burst der neutrophilen Granulozyten. [44]

**Ekto-ATPasen** sind Glykoproteine, die in Plasmamembranen, mit der aktiven Seite in die Extrazellulärmatrix zeigend, exprimiert werden und extrazellulär Adenosintriphosphat (ATP) und andere nukleoside Triphosphate hydrolysieren. Das resultierende Adenosindiphosphat (ADP) kann toxische Effekte auf die Wirtszellen haben. Beispielsweise zeigte sich, dass von Akanthamoeben freigesetztes ADP an P2y2 purinergen Rezeptoren der Wirtszellen bindet, wodurch das intrazelluläre Kalzium ansteigt, Caspase-3 aktiviert und schlussendlich eine Apoptose induziert wird. [23,45]

Akanthamoeben zeigen eine **Neuraminidase** Aktivität, die optimal bei einem pH Wert von 5 und bei Temperaturen zwischen 25 und 30 °Celsius ist. Die lebenden Amöben setzen Sialinsäure von den humanen Zellen frei, weswegen die Neuraminidase von Akanthamoeben relevant für die Kolonisierung und auch wichtig für die Entstehung von Schäden an den Sialinsäure-haltigen kornealen Epithelzellen sein könnte. [46]

Als potentieller Virulenzfaktor von Akanthamoeben, sowohl anti-oxidativ als auch anti-inflammatorisch wirkend, könnte das Enzym **Superoxid-Dismutase** fungieren, das Superoxide in Sauerstoff und Wasserstoffperoxide umwandelt. Superoxide sind eine der reaktivsten Sauerstoff-Spezies in der Zelle. Diese Enzyme sind somit ein wichtiger Abwehrmechanismus. In den Akanthamoeben konnte eine eisenhaltige, sowie eine Kupfer-Zink Superoxid-Dismutase identifiziert werden. [23,51]

Des Weiteren stellte sich heraus, dass Akanthamoeben eine **Plasminogenaktivator-Aktivität** zeigen, wodurch Plasminogen zu Plasmin des Wirts durch Akanthamoeben gespalten wird. Durch diesen Vorgang kann die Aktivierung proteolytischer Enzyme des Wirts, wie etwa Matrix-Metalloproteasen, initiiert werden, welche die Basalmembran und Komponenten der Extrazellulärmatrix (z.B. Kollagen Typ I und II, Fibronectin und Laminin) abbauen können. Durch die Produktion von **Elastase** durch Akanthamoeben, die Proteine des Bindegewebes (wie etwa Fibrinogen, Kollagen, Elastin und Proteoglykane) abbauen können, ist das mit diesem Enzym veränderte Gewebe anfälliger auf Sauerstoffradikale. [23,47]

**Proteasen** sind abbauende Enzyme, welche die Hydrolyse von Proteinen katalysieren. Die primäre Aufgabe dieser proteolytischen Enzyme bei Akanthamöben ist die Verdauung von Nahrungssubstanzen. Pathogene Akanthamöben weisen eine erhöhte extrazelluläre Aktivität dieser Enzyme auf, die darauf hinweist, dass dadurch die Invasion des Wirts erleichtert wird. Bislang konnten zahlreiche Serinproteasen identifiziert werden, die in der Lage sind Plasminogen zu Plasmin zu aktivieren, Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Immunglobulin G, Immunglobulin A, Albumin, Hämoglobin, Proteaseinhibitoren, Interleukin-1, Chemokine und Zytokine abzubauen. [16,23,48,49,54] Als eine sehr wichtige Komponente der Pathogenitätskaskade der Akanthamöben gilt eine Serinprotease, MIP133 genannt, die den Abbau von Keratozyten, Ziliarkörperzellen der Iris, retinale Pigmentepithelzellen, korneale Epithel- und Endothelzellen, sowie die Apoptose in Fresszellen veranlasst. Durch die Eigenschaften dieser Serinproteasen wird einerseits die Invasion des kornealen Stromas erleichtert und führt andererseits zu sekundären Reaktionen, beispielsweise Ödemen, Nekrosen und entzündliche Reaktionen. [15,23,50]

Überdies konnten einige Cysteinproteasen in Akanthamöben identifiziert werden. Auch die Aktivität von Metalloproteasen wurde nachgewiesen. [23]

Während der Phagozytose findet in Akanthamöben ein großer Umbau der Plasmamembran statt. Alle Enzyme, die für solch einen Zyklus des Ab- und Aufbaus notwendig sind, befinden sich in der Phospholipiddoppelschicht dieser Amöben, einschließlich der Phospholipase A2, Acyl-CoA:Lysolecithin-Acyltransferase, Acyl-CoA-Synthetase, Phospholipase A1 und Lysophospholipase. Die in der Plasmamembran enthaltene Lysophospholipase dient auch als Schutz vor zersetzenden Effekten der endogenen oder exogenen Lysophospholipide. Das Wissen über Phospholipasen ist bislang noch zu wenig detailreich. In einigen Studien wird berichtet, dass pathogene Akanthamöben, die zytopathogene Effekte an Säugetieren in-vitro verursachen, vermehrt Phospholipasen freisetzen. [23]

#### **1.2.4.2 Indirekte Faktoren der Akanthamöben-Pathogenität**

Die infektiöse Form der Akanthamöben (Trophozoiten) hat keine eindeutige Morphologie. Jedoch besitzt sie stachelartige Fortsätze, sogenannte *Acanthopodien* an ihrer Oberfläche, womit die Bindung an biologischen, aber auch nicht-biologischen Flächen möglich ist. Durch die amöboide Bewegung, in denen sie den Makrophagen/neutrophilen Granulozyten

ähneln, können Akanthamöben biologische Barrieren überwinden und in Gewebe über den extrazellulären Weg eindringen. [23]

Für eine erfolgreiche Übertragung der Akanthamöben sind diese in der Lage diversen Temperaturen, unterschiedliche Osmolaritäten und Veränderungen im pH-Wert zu widerstehen. Die Fähigkeit bei heißen Temperaturen und hoher Osmolarität zu wachsen korreliert mit der Pathogenität isolierter Akanthamöben und könnte einen guten Indikator des pathogenen Potentials darstellen. [16,17,23,54]

Durch zelluläre Differenzierung können sich Akanthamöben entweder in eine inaktive Zysten-Form, oder in eine vegetative, infektiöse Trophozoiten-Form begeben. Diese reversible Formveränderung basiert auf dem Einfluss von Umweltfaktoren. In der Zysten-Form, in der sie auch aerogen übertragen werden können, sind sie sehr resistent gegen verschiedene antimikrobielle Substanzen, extreme Temperaturen, pH-Werte, Osmolaritäten und gegen Austrocknung. Akanthamöben-Zysten können viele Jahre lang überleben und ihre Pathogenität beibehalten. Diese zelluläre Differenzierung stellt somit einen wichtigen Faktor in der Verbreitung der Akanthamöben und des Wiederauftretens der Infektion dar. [23,55]

Akanthamöben zählen zu den ubiquitärsten Protisten und treten in diversen Bereichen (beispielsweise in Trinkwasser, destilliertem Wasser aus Waschflaschen oder in der Antarktis) auf, weswegen es nicht überraschend ist, dass Menschen regelmäßig mit diesen Organismen in Kontakt treten, und bei vorhandenen Gelegenheiten (z.B. bei KL Trägerinnen und Trägern) schwerwiegende Infektionen hervorgerufen werden können. In einigen Regionen konnten Akanthamöben-Antikörper in bis zu 100% der getesteten Populationen festgestellt werden. [23]

Zudem spielen Biofilme eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AK. Ein Biofilm besteht aus einer Schleimschicht in der Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Pilze, Algen, Protozoen, eingelagert sind. Diese Schleimschicht wird vorwiegend in wässrigen Substanzen aber auch an anderen Materialien und medizinischen Produkten, einschließlich intravenösen Kathetern, Nahtmaterialien und Intraokularlinsen, gebildet. Durch die Kontamination des Kontaktlinsenbehälters können sich Biofilme auch an KL ausbilden, welche attraktive Nischen für Akanthamöben bilden, da diese Schleimschicht sowohl als Nahrungsgrundlage, aber auch als Schutz vor desinfizierenden Substanzen dient. Darüber

hinaus ermöglicht dieser Biofilm eine stärkere Bindung der Akanthamöben an KL. Diese an Nährstoffen reiche Schicht unterstützt die Umwandlung in die vegetative, infektiöse Trophozoiten-Form. Die Bindung an humane korneale Epithelzellen geschieht vornehmlich als Trophozoit, hingegen im Zysten-Stadium die Bindung wesentlich schwächer ist. Diese Forschungsergebnisse lassen darauf schließen, dass Biofilme in der AK bei KL Trägerinnen und Trägern eine wichtige Entstehungsrolle spielen und die Vermeidung der Biofilmbildung eine mögliche Präventivstrategie sein kann. [23,56,57]

Die Faktoren, die den Akanthamöben die Möglichkeit bieten, eine Erkrankung hervorzurufen basieren nicht ausschließlich auf Faktoren des Pathogens, sondern sind auch von den Determinanten des Wirts abhängig. [23, 58, 59] Im Vergleich zu der Inzidenzrate der AK bei KL Trägerinnen und Träger, welche in etwa 0,01-1,49/10.000 beträgt, ist die Anzahl der mit Akanthamöben kontaminierten Kontaktlinsenbehälter von asymptomatischen Trägerinnen und Trägern mit 400-800/10.000 auffallend hoch. [16,23] Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Faktoren wie die Empfänglichkeit des Wirts, Gewebespezifität, Tränenfaktoren, sekretorisches Immunglobulin A, korneale Traumen und auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle bei Infektionen mit Akanthamöben spielen könnten. Für ein genaueres Verständnis sind jedoch noch umfassendere Untersuchungen notwendig. [23]

### **1.2.5 Die therapeutischen Möglichkeiten der Akanthamöbenkeratitis**

Seit der ersten berichteten medizinischen Genesung einer AK im Jahr 1985 hat sich die Behandlung weiterentwickelt und man setzt nun auf eine aggressive medikamentös-operative Therapie bei frühestmöglicher Diagnose. Bislang wurde noch kein chemotherapeutischer Wirkstoff als einzelne, effektive Behandlung der AK beschrieben, unabhängig vom verursachenden Genotyp. Aufgrund der relativ geringen Anzahl an berichteten Fällen der AK, der variablen Pathogenität der verschiedenen Stämme und der intrinsischen Schwankungen des Erkrankungsprozesses, ist die Entwicklung eines effektiven therapeutischen Regimes erschwert. [16,23,54]

Die aktuelle Therapie der AK besteht aus topischen antimikrobiellen Substanzen. Aufgrund der Existenz der Akanthamöben-Zysten, die eine hohe Resistenz gegen die Therapie aufweisen, kommen die Wirkstoffe meist in Kombinationen zur Anwendung. Die meisten

der aktuell in Verwendung gebrachten topischen Substanzen wirken effektiv sowohl gegen Trophozoiten, als auch gegen die Zysten-Form, wie die Biguanide. Von der Gruppe der Biguanide wird das Polyhexamethylenbiguanid (PHMB), welches in niedriger Konzentration (0,02%) effektiv, aber toxisch gegen korneale Zellen wirkt, verwendet, sowie das Chlorhexidin, das in minimaler Dosierung nicht toxisch gegen korneale Epithelzellen ist. Chlorhexidin (0,02%) wird häufig kombiniert mit einem Diamidinderivat, wie beispielsweise Propamidin-Isethionat (0,1%), Dibromopropamidin (0,15%), Hexamidin (0,1%) und Neomycin. Diese Kombinationen zeigen gute Resultate, wenn die Behandlung im frühen Krankheitsstadium erfolgt. [23,27,54,61,62]

Im chirurgischen Management der AK war das Standbein der Therapie die penetrierende Keratoplastik (PK), bevor aggressive medikamentöse Therapie bei möglichst früher Diagnose entwickelt hat. [23,26,63,64,65] Bei der PK handelt es sich um eine Hornhaut-Transplantation, bei der die erkrankte Kornea durch eine Spender-Kornea ersetzt wird. Als klare Indikation eines operativen Eingriffs gilt die bevorstehende und auch bereits offene korneale Perforation. Ansonsten sind andere Indikationen für chirurgische Eingriffe nicht gut definiert. Die PK sollte angewandt werden, wenn der infektiöse Prozess in Richtung parazentralem kornealen Stroma, trotz maximaler antimöbischer Therapie, voranschreitet. Besonders bei lokalisierten Infektionen kann die Anwendung der PK erfolgsversprechend sein.

Auch die ausgedehnte Verwendung der photorefraktiven Chirurgie hat in der Therapie der AK seinen Platz gefunden. Kandori et al. [66] beschrieben vier Fälle im Jahr 2010, die im frühen Stadium die AK mit der standard-topischen Therapie behandelt wurden. Jedoch entwickelten sich große korneale Abszesse im oberen Drittel des Stromas, die mittels Excimerlaser mit der phototherapeutischen Keratektomie (PTK) entfernt wurden. Bei allen Augen kam es zu keiner Reinfektion und die Sehschärfe lag zwischen 20/16 und 20/25. Das Crosslinking ist eine weitere neue Therapiemöglichkeit der AK. Dabei wird die Hornhaut des Auges durch eine Kombination aus Riboflavin und UV-Bestrahlung vernetzt. Garduño-Vieyra et al. [38] führten ein Kollagen-Crosslinking an einem Patienten anstelle der topischen medikamentösen Behandlung durch. Bereits nach 24 Stunden zeigten sich signifikante Verbesserungen, während die Symptome innerhalb von drei Monaten verschwanden und eine Sehschärfe von 20/20 nach 5 Monaten festgestellt werden konnte. [23]

### **1.3 Grundlagen von Mitomycin C**

Bereits im Jahre 1956 wurde Mitomycin A und B aus dem Bakterium *Streptomyces caespitosus* isoliert. Nur wenig später konnte auch das antibiotisch und zytostatisch wirkende Medikament Mitomycin C (MMC) entdeckt werden. [68-70] Genau genommen kommt es durch seine alkylierende Wirkung zu einem DNA-Cross-Link zwischen Adenin und Guanin, wodurch die Synthese der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und dadurch die Mitose der Zelle gehemmt wird. [68,72,73]

Die DNA-Alkylierung durch MMC kann prinzipiell in jedem Stadium des Zellzyklus stattfinden. Die biologischen Konsequenzen sind jedoch während der DNA-Synthese, besonders während der späten G1- und S-Phase, am stärksten. An der MMC-Wirkung sind besonders schnell teilenden Zellen betroffen. Demzufolge wirkt MMC genotoxisch und hemmt in hohen Konzentrationen auch die zelluläre RNA- und Protein-Synthese. [68,74-79]

Der exakte Mechanismus der MMC-Toxizität ist jedoch noch nicht vollständig gelöst. Die Fähigkeit von MMC Sauerstoffradikale [80] zu produzieren, oder die sekundäre Amplifikation des Tumornekrosefaktors (TNF) [81], werden in einigen Studien als zusätzliche Mechanismen der Toxizität beschrieben. Als wichtigster zytotoxischer Faktor des MMC gilt jedoch der extensive, intrazelluläre Glutathion-Abbau. [68,82]

Aufgrund der starken Wirkung von MMC auf die Zellreplikation findet dieses Medikament auch seine Anwendung in der Ophthalmologie, da damit die Narbenbildung gehemmt werden kann. Zu diesem Zwecke wurde MMC bereits 1991 nach einer Excimer-Laser-Operation topisch angewandt. [83] Seit mehr als 10 Jahren wird in der refraktiven Chirurgie MMC prophylaktisch eingesetzt, um nach der oberflächlichen Abtragung von Hornhautgewebe Hornhauttrübungen zu verhindern. Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf proliferierenden kornealen Epithelzellen, stromalen, endothelialen und konjunktivalen Zellen und auch Fibroblasten der Tenon-Kapsel wird MMC auch gegen Glaukom, Pterygium und Neoplasien der Konjunktiva und des Endothels eingesetzt. [68,84-89]

### 1.3.1 Die Bedeutung von Mitomycin C bei refraktivchirurgischen Eingriffen

Die Hornhautwundheilung trägt zur Effizienz und Sicherheit aller refraktiv-chirurgischen Methoden, inklusive der Photorefraktiven Keratektomie (PRK) und Laser-in-situ-Keratomileusis (LASIK), bei. Die Variabilität der Wundheilung ist meist der Hauptfaktor für Komplikationen (beispielsweise Überkorrektur, Unterkorrektur und Trübung des Stromas), die durch diese Operationstechniken auftreten können.[68,90]

Hornhauttrübungen resultieren als unkalkulierbarer Prozess der normalen Wundheilung der Kornea. Vor allem das Aufkommen von den hoch kontraktiven, reduziert transparenten Zellen, die sogenannten Myofibroblasten, spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer Hornhauttrübung. Myofibroblasten produzieren außerdem reduziert intrazelluläres Crystallin. Auch durch entstehende Abweichungen in der extrazellulären Matrix des vorderen Stromas, Änderungen in der Dichte und des Phänotyps der Zellen, und durch funktionelle und strukturelle Veränderungen der epithelialen Basalmembran kann eine korneale Trübung hervorgerufen werden. Diese Veränderungen können nach photorefraktiven Operationen, besonders bei hohen Korrekturniveaus, auftreten, die dann klinisch auffällig sein können. [68,91,92]

Die komplexe Kaskade des Heilungsprozesses beginnt initial nach der epithelialen Verletzung durch die kontinuierliche Freisetzung der Epithelzellen von zahlreichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren (wie beispielsweise Interleukin-1 $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , etc.). Diese Interleukine können nur durch verletzte oder tote Epithelzellen produziert werden. Auch die Wachstumsfaktoren können bei normalen Konzentrationen die Basalmembran nicht überschreiten und somit nicht in das korneale Stroma eindringen. Dies gelingt folglich nur dann, wenn die Basalmembran geschädigt oder nicht vorhanden ist. Defekte an den Epithelzellen und der Basalmembran erlauben den Zytokinen und Wachstumsfaktoren den Eintritt in das Stroma und somit die Bindung an entsprechenden Rezeptoren der Keratozyten, wodurch sie eine Kaskade an biologischen Reaktionen auslösen. Dies führt zu wichtigen Veränderungen im Stroma, die an der Wundheilungsantwort teilhaben, wie die Apoptose und Nekrose von Keratozyten und deren Aktivierung und Proliferation, die Produktion von Chemokinen und Bildung von

Myofibroblasten. Bei der Differenzierung der Myofibroblasten aus Vorläuferzellen spielt besonders der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle. [68,93-102]

Darüber hinaus spielen bei der Entstehung einer Hornhauttrübung viele andere Faktoren eine Rolle, unter ihnen beispielsweise die postoperative Irregularität der Stroma-Oberfläche, die Dauer der epithelialen Defektheilung, die Tiefe der Ablation, die Entfernung der epithelialen Basalmembran, UV-Licht Exposition und mögliche genetische Einflüsse. [68]

Trübungen der vorderen Hornhaut treten in 1% bis 4% der Augen, an denen eine oberflächliche Ablation (z.B. PRK) ohne MMC-Prophylaxe vorgenommen wurde, auf. Nach PRK konnten zwei Typen an Hornhauttrübungen beobachtet werden. Die vorübergehende Trübung tritt häutiger auf und erscheint meist zwischen einem Monat und drei Monaten nach dem operativen Eingriff und steht sehr selten mit klinischen Symptomen in Verbindung. Meistens verschwinden diese innerhalb eines Jahres. Die andere Art der Trübung (späte Trübung) ist weitaus seltener und tritt meist zwischen zwei und fünf Monaten nach dem Eingriff am Auge auf. Jedoch kann es auch Jahre nach der PRK auftreten, wenn das Epithel verletzt wurde. [68,103-106]

Das Verschwinden der Hornhauttrübung steht in Assoziation mit dem Weggehen der Myofibroblasten und der Remodellierung unorganisiertem stromalen Kollagen durch Keratozyten. Myofibroblasten können entweder durch Apoptose untergehen oder sich durch Transdifferenzierung zur Vorläuferzelle zurückbilden. [68,107]

In den letzten Jahren hat sich die intraoperative Anwendung von topischen MMC nach einer PRK als effektive Zusatzbehandlung herausgestellt, um die Bildung subepithelialer Hornhauttrübungen, besonders nach der Korrektur von starker Kurzsichtigkeit, zu limitieren. [68] Netto et al. [106] untersuchten den Effekt von prophylaktischem und therapeutischen MMC an kornealer Apoptose, Zellproliferation, Trübung und der Langzeit Keratozyten-Dichte. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen (0,02% und 0,002%) und drei unterschiedliche Einwirkzeiten (12 Sekunden, 1 Minute und 2 Minuten) der MMC-Applikation nach einer PRK von -9 Dpt an Hasen untersucht. Diese Studie demonstrierte, dass die prophylaktische und therapeutische Anwendung mit MMC effektiv als Prävention und Behandlung der subepithelialen Trübung wirkt.

Die Anwendung von MMC induziert die Apoptose von Keratozyten und Myofibroblasten, wobei als prädominanter Effekt die Blockade der Proliferation von Keratozyten und

Vorläuferzellen der Myofibroblasten gilt, wobei als Warnsignal die anhaltende Reduktion der Keratozytendichte im anterioren Stroma für weitere, zukünftige Komplikationen beschrieben wird. Somit sollte die Behandlung nur jenen Patienten vorbehalten werden, bei denen ein signifikantes Risiko für die Entwicklung einer Hornhauttrübung nach der PRK vorliegt. [106]

### **1.3.2 Aktuelle Therapieempfehlung von Mitomycin C**

Bei primären Augenoperationen mit Myopie größer als fünf bis sechs Dpt und für Astigmatismus mit oder ohne Kurzsichtigkeit mehr als 2,5 Dpt wird MMC in der Konzentration von 0,02% und einer Einwirkzeit von 30 Sekunden empfohlen. MMC (0,02%) wird üblicherweise mit einer Applikationsdauer von 60 Sekunden bei sekundären Eingriffen wie LASIK, PRK und radialer Keratektomie verwendet. [68,91]

In der refraktiven Chirurgie konnte das Profil der Langzeitsicherheit noch nicht vollständig überprüft werden. Die Anwendung dieses Medikaments in diesem Bereich findet weiterhin in der Off-Label-Verwendung statt. Die Effekte auf die Keratozyten und die Endothelzellendichte führen jedoch zur stärksten Beunruhigung dieses Wirkstoffes. [91]

## **1.4 Die Grundprinzipien der Phototherapeutischen Keratektomie mit dem Excimerlaser**

Die „U.S. Food and Drug Administration“ bewilligte im Jahr 1995 die Phototherapeutische Keratektomie (PTK) für die Beseitigung von Hornhauttrübungen, oder zur Behandlung von rezidivierenden kornealen Erosionen. Die dazu eingesetzten Excimerlaser verwenden ultraviolettes Licht mit einer Wellenlänge von 193 Nanometer (nm) um molekulare Bindungen im Gewebe in einem generierten Prozess niedriger Hitze, der als „Photoablation“ bezeichnet wird, auseinander zu brechen. Je nach Anwendungsgebiet können Excimerlaser mit einem geringen Durchmesser als Laserstrahl („small spot“), oder auch mit größerem Behandlungsdurchmesser („broad beam“) von 6 bis 6,5mm in Einsatz gebracht werden. [108]

Die PTK kommt in einem sehr breiten Spektrum kornealer Pathologien zur Anwendung, wie beispielsweise zur Entfernung von anterioren Narben nach einer Verletzung, Erkrankung oder nach chirurgischen Eingriffen, zur Glättung der Hornhautoberfläche in Augen mit stromalen Dystrophien, nach Traumata oder chirurgischen Komplikationen, sowie zur Entfernung von überschüssiger epithelialer Basalmembran in Augen mit rezidivierenden kornealen Erosionen. [108-111] Dementsprechend können mit dieser Behandlungsmethode effektiv viele korneale Störungen therapiert werden, bei denen anderenfalls eine manuelle Keratektomie oder eine korneale Transplantation notwendig wäre. [108]

Für die Planung und Durchführung einer PTK ist es essenziell ein umfassendes Verständnis von den Effekten des Excimerlasers an dem kornealen Gewebe und dem refraktiven Status des Auges zu haben. Der erste hilfreiche Hinweis für die „broad-beam“ Excimerlaser ist, dass pro Puls des Lasers in etwa 0,25  $\mu\text{m}$  des normalen Hornhautgewebes in der Ablationszone abgetragen werden. Der zweite Grundsatz ist, dass 50 Pulse des „broad-beam“ Excimerlasers zu einer hyperopischen Verschiebung von annäherungsweise 1,00 Dpt führen. Dieses Ergebnis kann verwendet werden, um abzuschätzen, wie viele Pulse notwendig sind, um die Narbe zu entfernen und welche refraktive Veränderung von diesem Verfahren zu erwarten ist. Erforderlichenfalls kann eine kompensatorische PRK durchgeführt werden, um das Ergebnis des Sehvermögens nach der PTK zu optimieren. Wenn durch eine primäre PTK eine Hyperopie von mehr als 5,00 Dpt entstanden ist, dann wird typischerweise keine gleichzeitige PRK zur Korrektur durchgeführt, da durch solch

hohe hyperopische Korrekturen häufig signifikante optische Aberrationen hervorgerufen werden. [108]

### **Laserprinzip des Excimerlasers**

Durch Licht können Atome oder Moleküle, die sich in einem energetisch tieferen Zustand befinden (beispielsweise im Grundzustand), in einen energetisch angeregten Zustand transformiert werden. Der Grundzustand gilt als stabiles Niveau, weil es dem energetisch niedrigsten Level entspricht. Für manche Moleküle jedoch ist der Grundzustand nicht so stabil, da diese in diesem Zustand nicht zusammengehalten werden, weswegen sie nur als angeregte Moleküle existieren. [112]

Durch elektrische Entladung entstehen aus einem Gemisch aus einem Edelgas (Ar, Kr, Xe), einem Halogen (Fluor, Chlor) und einem Puffergas (He, Ne) ionisch gebundene Komplexe, z.B. ArF, KrF, oder XeCl, die sich im elektronisch angeregten Zustand befinden. Durch Zuführung von Energie werden diese Moleküle aus dem thermischen Gleichgewicht gebracht und können schließlich unter Freisetzung von Photonen bzw. UV-Licht zerfallen und in den Grundzustand übergehen. Somit ergibt sich ein sehr effizienter, gepulster UV-Laser mit Wellenlängen von 351-193nm. Die Wellenlänge ist abhängig durch das bei der Anregung entstehende Molekül. Die Pulsdauer liegt im Nanosekundenbereich, die Pulsenergien bis in den Joule-Bereich und die mittleren Leistungen bei einigen zehn Watt. [112]

Das Wort „Excimer“ setzt sich zusammen aus „excited“ (angeregt) und „dimer“ (zwei gleiche Atome oder Moleküle). Aufgrund dessen, dass heute vorrangig Edelgas-Halogenide als Lasermedium verwendet werden, wird auch der Begriff „Exciplex“ („excited“ und „complex“) verwendet. [112]

In der refraktiven Chirurgie weist der ArF-Excimerlaser (193 nm Wellenlänge) mit seiner kurzen Pulsdauer die beste Ablationsqualität auf. [112]

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Bei dieser deskriptiven Darstellung einer Fallserie werden die Daten von sechs Augen (sechs Patientinnen und Patienten, zwei weiblich, vier männlich) mit einer Akanthamöbenkeratitis retrospektiv zwischen den Zeitraum von 2009 bis 2018 an der Universitäts-Augenklinik des LKH-Univ.-Klinikum Graz analysiert. Es werden nur Patientinnen und Patienten eingeschlossen, bei denen ein Erfolg des topischen Therapieregimes mit Propamidin und Polyhexamethylenbiguanid (PHMB) für mindestens drei Monate ausblieb und infolgedessen nach Entfernung des Epithels mittels phototherapeutischer Keratektomie und MMC (0,02%) für 30 - 90 Sekunden therapiert wurden. Das Durchschnittsalter der Patientinnen und Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation  $35,8 \pm 15,5$  Jahre. Der postoperative Beobachtungszeitraum betrug zwischen 6 Monate und 12 Jahre.

### **2.2 Datenerhebung**

Es wurden die Datensätze von jenen Patientinnen und Patienten, die im Zeitraum von 2009 bis 2018 an der Universitäts-Augenklinik Graz aufgrund einer therapieresistenten Akanthamöbenkeratitis mittels PTK und MMC 0,02% therapiert wurden, sorgfältig erhoben und anonymisiert ausgewertet. Dabei wurde das Krankenhausinformationssystem der Universitäts-Augenklinik Graz, sowie die Akten in Form von Papierdokumenten der Patientinnen und Patienten zur Erhebung herangezogen. Digitale Aufnahmen diverser Untersuchungen wurden in die Diplomarbeit eingebunden.

### **2.3 Statistische Auswertung**

Aufgrund der niedrigen Fallzahl dieser Arbeit reduziert sich der statistische Teil auf der deskriptiven Statistik. Die dabei angegebenen statistischen Parameter, wie beispielsweise der Mittelwert, wurden nach der Eingabe der Daten in eine Microsoft Excel Tabelle mittels SPSS berechnet. Zur besseren Veranschaulichung der erhobenen Daten wurde eine Tabelle erstellt. Aufgrund des zahlenmäßig kleinen Patientenkollektivs würde die Anwendung von induktiven statistischen Verfahren keine große Aussagekraft mit sich bringen. Die vorliegenden Ergebnisse wurden in Form von Fallberichten und anschließend zusammengefasst präsentiert.

## **2.4 Einhaltung ethischer Richtlinien**

Alle beschriebenen Untersuchungen am Menschen wurden im Einklang mit dem nationalen Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 durchgeführt. Im Rahmen der retrospektiven anonymisierten Auswertung und Falldarstellung wurde ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Universität (EK-Nummer: 32-419 ex 19/20) eingeholt. Eine Einverständniserklärung war nicht notwendig.

## **2.5 Fallvorstellungen**

### **2.5.1 Patient 1**

Dieser Patient ist männlich, zum Erkrankungszeitpunkt 26 Jahre alt und wurde Anfang August 2009 an der Augenklinik vorstellig. Er ist Träger weicher Monats-KL. Seit einer Pool-Party, welche einige Wochen vor der ersten ambulanten Vorstellung stattfand, verspürte er intermittierende brennende Schmerzen und hatte ein gerötetes rechtes Auge. Unter der Behandlung des niedergelassenen Facharztes wurden die Symptome zwischenzeitlich mit einer Tobramycin-haltigen Augensalbe (AS) besser. Subjektiv konnte er keine Sehverschlechterung wahrnehmen. Die Augen waren in der Früh nie verklebt. In der Spaltlampenuntersuchung zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein geschwollenes Oberlid, eine gemischt diffuse und limbale Injektion der Konjunktiva sowie eine gestrippte Kornea im unteren Hornhaut-Pol mit kleinen punktförmigen Infiltraten teilweise auch stromal gelegen, die in einem horizontalen Band angeordnet waren. (Abb. 7A) Aufgrund der Anamnese und der Symptomatik stellte man vorerst den Verdacht einer schwimmbadassoziierten Keratokonjunktivitis, die man antibiotisch therapierte.

Etwa zehn Tage später kam der Patient mit einem unveränderten Befund erneut vom niedergelassenen Facharzt. Dieser verschrieb ihm eine Aciclovir-haltige Augensalbe, wodurch sich das subjektive Empfinden des Patienten deutlich verschlechterte. Die Entzündung der Hornhaut drang in die tieferen Schichten der Kornea vor. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Patient die KL seit mehreren Monaten nicht mehr getragen. Die lokale Therapie wurde auf eine Chloramphenicol-haltige AS umgestellt.

Am nächsten Tag wurde ein kornealer Abstrich entnommen und der mitgebrachte KL-Behälter mikrobiologisch untersucht, wobei in beiden Akanthamöben-Zysten positiv detektiert werden konnten. Die lokale Therapie wurde auf Chlorhexidine 0,02% und PHMB

0,1% stündlich im Wechsel umgestellt. Der BCVA (*best corrected visual acuity*), also die Sehschärfe mit bestmöglicher Korrektur, betrug 0,5 (log MAR).

Bei dem Kontrolltermin am darauffolgenden Tag waren die Beschwerden subjektiv besser und der Patient konnte einen Rückgang der Schwellung wahrnehmen. In der Spaltlampenuntersuchung zeigte sich jedoch eine Progredienz der punktförmigen kornealen Infiltrate, die nun halbmondförmig in der unteren Hornhauthemisphäre vorhanden waren.

Bei sehr engmaschigen Kontrollen konnte kein regredienter Befunde verzeichnet werden. Ganz im Gegenteil: Mitte September zeigte die gesamte Hornhaut in der Spaltlampenuntersuchung punktförmige Infiltrate mit einem umgebenden, zarten Epithelödem und eine beginnende Trübung. Im nasalen Bereich war ein „kleiner Gang“ in der Hornhaut sichtbar. (Abb. 7B) Das Therapieregime wurde zu diesem Zeitpunkt auf antibiotische AT und PHMB 0,1% alle zwei Stunden umgestellt.

Anfang Oktober wurde eine Kürettage der Kornea durchgeführt, die wiederholt positiv auf Akanthamöben-Zysten war. Der Patient wurde daher zur intensiven lokalen Tropftherapie stationär aufgenommen.

Trotz engmaschiger intensivster topischer Tropftherapie konnte keine Verbesserung festgestellt werden (Abb. 7C), weswegen am sechsten Tag des stationären Aufenthaltes eine phototherapeutische Keratektomie mittels dem Excimer Laser System Zeiss Mel 80™ (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) mit einer Ablationszone von 8,0 mm nach Entfernung des Epithels durchgeführt wurde, wobei die Ablationstiefe zentral 140 µm betrug. Areale in der Peripherie der Hornhaut, welche Stromainfiltrate aufwiesen, wurden mit einem mittels „joy-stick“ geführten Laserstrahls kleinen Durchmessers von 0,7 mm („small spot“) gelasert. Mitomycin C 0,02% wurde für 90 Sekunden appliziert und das Auge anschließend mit einer physiologischen Kochsalzlösung gespült. Nach der PTK wurde das topische Therapieregime mit PHMB 0,1% und Chlorhexidin 0,02% je sechsmal täglich für drei Wochen fortgesetzt.

Drei Wochen nach durchgeführter PTK wurde der Patient mit einer kleinen, zentralen kornealer Erosio und einer vor allem zentralen Trübung entlassen. Die lokale Therapie wurde mit einer Chloramphenicol-haltigen AS weitergeführt.

Anfang November war die Hornhaut noch zentral offen. Die fortlaufende Therapie beinhaltete eine Ofloxacin-haltige Augensalbe und pflegende Augentropfen. Die Hornhaut wurde mit der Zeit insgesamt immer klarer. Zentral zeigte sich im Dezember noch eine postoperative Hornhauttrübung (Haze) bei einem geschlossenen Epithel. (Abb. 7F) Die Nachuntersuchungszeit betrug insgesamt 9 Jahre mit einem BCVA von 0,3 (log MAR). (Abb. 7G)

Abbildung 7: Prä-PTK und post-PTK Fotografien an der Spaltlampe von diesem Patient.

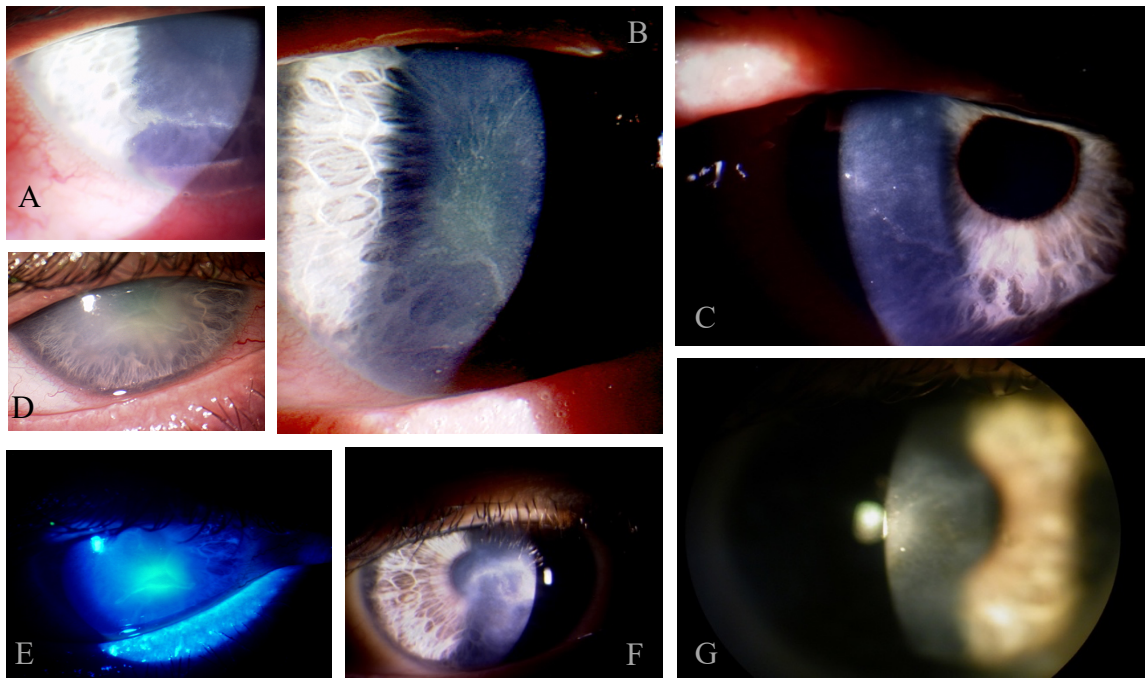


Abbildung A, B und C zeigen präoperative Fotos der betroffenen Kornea. Diffuse und limbale Injektion der Bindehaut, kleine punktförmige korneale Infiltrate, die in einem horizontalem Band angeordnet sind, Epithelödem und leichte Trübung. D, E, F und G zeigen post-PTK Fotografien mit einer zentralen Trübung drei Wochen danach. E stellt eine Aufnahme im Blaulicht dar. F zum Zeitpunkt 15 Wochen mit noch einer zentralen Narbe und schließlich G nach 15 Jahren post-operativ.

## 2.5.2 Patientin 2

Bei diesem Fall handelt es sich um eine 22-jährige weibliche Person. Mitte Juli 2014 konnte eine AK-Zysten in einem Abstrich nachgewiesen werden. Sie trug weiche Kontaktlinsen (Monatslinsen). Es wurde mit einer topische Therapie, bestehend aus PHMB und Chlorhexidin 0,02%, begonnen. Zu diesem Zeitpunkt (präoperativ) war der BCVA 1,0 (log MAR).



Abbildung 8: Ein Bild der infizierten Kornea in der Spaltlampenuntersuchung im Juni 2014. In der unteren Hälfte eine bogenförmige Epithelschlussleiste mit kleinen subepithelialen Trübungen, sowie kleine Infiltrate sichtbar.

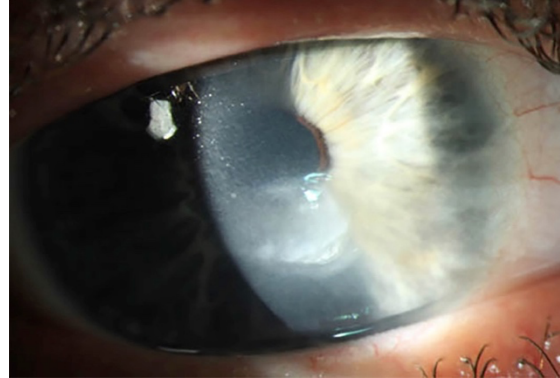


Abbildung 10: progredienter Defekt in der betroffenen Hornhaut im August 2014. Es zeigt sich eine ringförmige Narbe der Hornhaut.

Vier Monate nach der Diagnosestellung wurde nach einer vorausgehenden Epithelabtragung mit dem Excimer Laser System Zeiss Mel 80™ (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) eine PTK durchgeführt. Die Ablationszone betrug bei diesem Eingriff 8,0 mm und die Ablationstiefe zentral 100 µm. Unmittelbar nach dem Eingriff konnten weiterhin Akanthamöben-Zysten festgestellt werden.

In den darauffolgenden 3 Wochen nach dem phototherapeutischen Eingriff wurde die Therapie mit PHMB fortgeführt.



Abbildung 9: Bild der betroffenen Hornhaut 4 Tage nach Durchführung der PTK

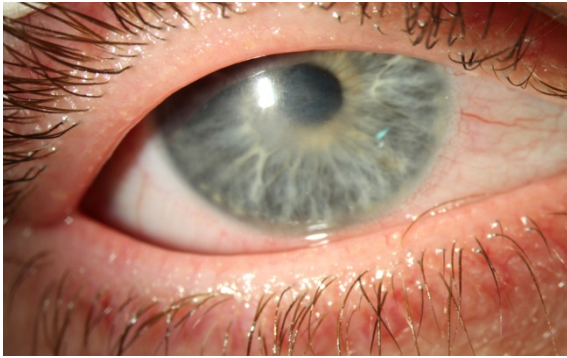


Abbildung 11: 3 Wochen nach dem Eingriff ist die Hornhaut noch etwas trüb.

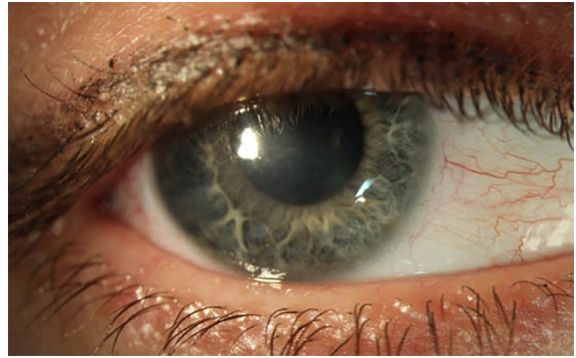


Abbildung 10: 10 Wochen nach erfolgter PTK

Im September 2015 betrug der UCVA (*uncorrected visual acuity*) 0,1 (log MAR).

### 2.5.3 Patient 3

Dieser männliche Patient ist 48 Jahre alt und präsentierte sich im Juli 2014 mit einer Keratitis mit darauffolgend diagnostizierter Akanthamöbenkeratitis. Beginnend wurde eine topische Therapie mit Chlorhexidin 0,02% und Propamidin 0,1% eingeleitet, wobei nach zwei Wochen das Propamidin wieder abgesetzt und nur mit Chlorhexidin 0,02% sechsmal täglich fortgeführt wurde. Der präoperative BCVA betrug 0,5 (log MAR).

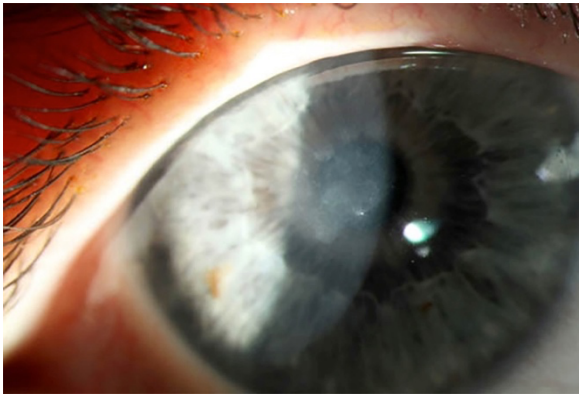


Abbildung 13: Dieses Foto zeigt die Hornhaut des Patienten am 23. Juli 2014, an dem eine Keratitis festgestellt wurde

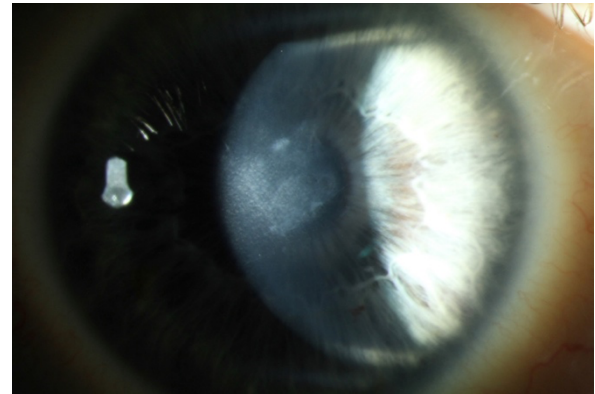


Abbildung 12: Foto der Spaltlampenuntersuchung vom 20. August 2014

Zwei Monate nach diagnostizierten AK wurde mittels dem Excimer Laser System Zeiss Mel 80™ (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) eine PTK mit 8,00 mm Ablationszone nach erfolgter Epithelabtragung durchgeführt, bei der die Ablationstiefe zentral 140 µm betrug. Nach diesem Eingriff konnten noch immer Akanthamöben-Zysten identifiziert werden. Die antiamöbische Therapie wurde gestoppt und eine topische Therapie mit Tobramycin für drei Wochen gestartet. Der Patient wurde für weitere 28 Monate nachkontrolliert und sein BCVA betrug 0,3 (log MAR).

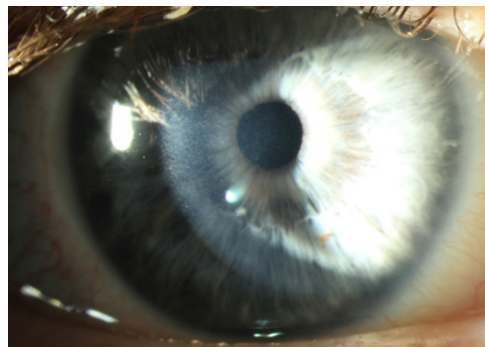


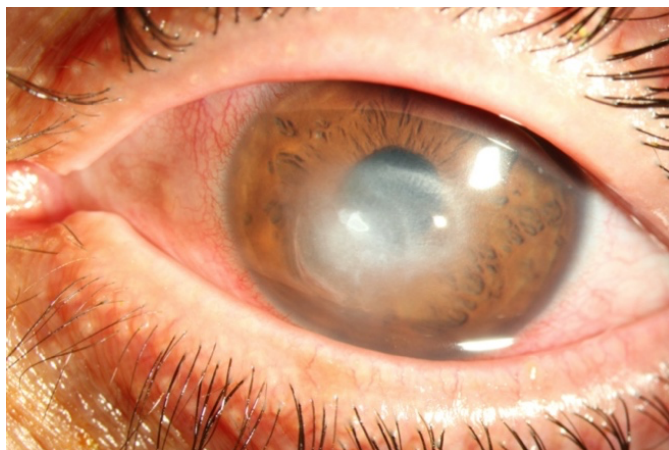
Abbildung 14: 4 Wochen nach der PTK zeigte sich dieses Bild in der Spaltlampenuntersuchung

## 2.5.4 Patient 4

Anfang April 2017 war ein 33-jähriger Patient mit schmerzhaften, rezidivierenden Hornhauterosionen am linken Auge in der Augenklinik vorstellig mit einem Verdacht auf eine herpetische Ursache. Er berichtete von Beschwerden seit sechs Wochen, die damals vermutlich durch einen KL-Schaden verursacht wurden. Zwischenzeitlich verbesserte sich die Symptomatik durch die systemische Einnahme und topische Applikation von Aciclovir des linken Auges. Der BCVA betrug zu diesem Zeitpunkt 0,16 (log MAR). Ein lokaler Therapieversuch mit Aciclovir, Gentamicin, Tobramycin und pflegenden Augentropfen wurde gestartet. Dieser Patient war ebenfalls Kontaktlinsenträger (weiche Monatslinsen) seit über zehn Jahren. Die KL hat er schon seit sechs-sieben Wochen nicht mehr in Verwendung gebracht hatte. Als Kontaktlinsen-Flüssigkeit verwendete er eine Kombi-Lösung.

Zwei Tage später kam der Patient zur erneuten Kontrolle mit starken Schmerzen. Ein auf Akanthamöben-Zysten positiver Befund eines Hornhauabstriches stellte die Diagnose der Akanthamöbenkeratitis. In der Spaltlampenuntersuchung zeigte sich eine gemischte Injektion der Konjunktiva, an der Hornhaut eine disziforme Keratitis mit aktiven Rand und zentral eine ringförmige, weißliche Trübung, limbusnahe bei circa 2 Uhr weißliche, runde Infiltrate. Die Hornhaut-Hinterwand wies im unteren Bereich ein flächiges Präzipitat auf. Am selben Tag wurde der Patient in der Augenklinik stationär aufgenommen, um eine intensive topische Therapie durchzuführen. Dieses Therapieregime setzte sich aus PHMB 0,02% und Propamidin 0,1% stündlich im Wechsel, Moxifloxacin und einer Augensalbe mit Dexamethason und Gentamicin zusammen. Zusätzlich wurden per oral Miltefosin 10mg einmal täglich sowie Methylprednisolon 4mg einmal täglich verabreicht. Nach fünf Wochen wurde der Patient schließlich wieder entlassen. Die medikamentöse Therapie vom stationären Aufenthalt wurde weitergeführt.

Bei einer Kontrolluntersuchung Anfang Juli war der Patient schmerzfrei. Der BCVA betrug 0,16 (log MAR). In der Spaltlampe zeigte sich ein Epitheldefekt in der Kornea nasal-unten, eine Trübung, die nach zentral über den Defekt hinaus reichte, und eine zentrale weißliche Auflagerung. Das Epithel der Hornhaut war geschlossen, zeigte aber eine zentral kleine Kalkscholle. (Abb. 9)



*Abbildung 15: präoperatives Foto des betroffenen Auges zwei Monate vor PTK:*

*Epitheldefekt nasal-unten mit einer Trübung, die nach zentral über den Defekt hinausreicht. Zentral kleine Kalkscholle sichtbar. Gemischte konjunktivale Injektionen.*

Nachdem jegliche durchgeführten medikamentösen Therapieoptionen keinen Erfolg brachten, wurde Anfang September 2017 eine PTK mit dem Excimer Laser System Zeiss Mel 80™ (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die Ablationzone betrug 8,0 mm und die Tiefe 100 µm. MMC 0,02% wurde für 30 Sekunden appliziert. Nach erfolgter Durchführung wurde eine therapeutische KL auf die Kornea aufgesetzt. Nach der Operation wurden Tobramycin AT und Dexamethason 1mg/ml AT einmal täglich verabreicht, sowie die systemische Therapie mit Miltefosin und Methyprednisolon wie beschrieben fortgeführt. Eine Woche nach erfolgter PTK wies die Hornhaut in der Spaltlampenuntersuchung eine zentrale postoperative Hornhauttrübung (Haze) und eine Erosion nasal-unten auf. Alle Medikamente außer Tobramycin, welches für weitere zwei Wochen fortgeführt wurden, wurden schrittweise abgesetzt.

Der Nachbehandlungszeitraum betrug sechs Monate mit einem BCVA von 0,5 (log MAR).

### 2.5.5 Patient 5

Dieser Patient ist männlich, zum Erkrankungsbeginn 25 Jahre alt und kam Ende November 2017 in die Augenklinik vom niedergelassenen Facharzt mit Verdacht auf eine Herpes-simplex Keratitis am linken Auge. Seit zwei Tagen wurde eine AS mit Aciclovir appliziert. Der Patient verspürte zunehmende Schmerzen bei subjektiv leicht milchigem Sehvermögen des linken Auges. Der BCVA betrug zu diesem Zeitpunkt 0,8 (log MAR). In der Spaltlampenuntersuchung zeigte sich eine Injektion der Konjunktiva. Die Hornhaut wies strangförmige Trübungen sowie Epithelunruhen auf. Als antivirale Therapie wurde topisch mit Aciclovir (3%) und Gentamicin gestartet. Zusätzlich wurde Valaciclovir 500mg einmal täglich eingenommen. Da dieser Patient Träger weicher Monatslinsen war, wurde eine strikte Kontaktlinsenkenz angeordnet.

Zehn Tage später konnte trotz dem medikamentösen Therapieregime keine Verbesserung festgestellt werden, wodurch eine Wiedervorstellung an der Augenklinik stattfand. Zwischenzeitlich war der Patient beim niedergelassenen Facharzt zur Kontrolle und die Dosis von Valaciclovir 500mg auf viermal täglich angehoben. Die topische Therapie wurde bis auf pflegende Augentropfen abgesetzt. Valaciclovir 500mg per oral wurde auf zweimal täglich reduziert.

Ende Dezember kam der Patient wieder auf die Augenklinik aufgrund persistierender brennender Schmerzen ohne subjektiver Verbesserung. In der Spaltlampenuntersuchung zeigte sich ein zentrales Hornhautödem, im unteren Bereich der Kornea Epithelschlussleisten, mehrere Trübungen des Stromas, jedoch keine eindeutigen Dendriten, die für die Herpes-simplex Keratitis ein Charakteristikum darstellen. Die lokale Therapie wurde umgestellt auf Prednisolon und Valaciclovir per oral 1000mg dreimal täglich eingenommen.

Da seit über einem Monat kein Ansprecher des antiviralen Therapieregimes stattfand, wurde beim Kontrolltermin 4 Tage später ein Hornhautabstrich zur Untersuchung mittels PCR, sowie zur Anlage eines Antibiogramms und einer Kultur durchgeführt. Der Patient berichtete über verminderte Schmerzen, jedoch über ein subjektiv verschlechtertes Sehen, das aufgrund der Gabe eines Mydriatikums auftrat. Die topische Therapie wurde auf Dexamethason zweimal täglich umgestellt. An der Einnahme von Valaciclovir wurde keine Umstellung vorgenommen.

Im Befund vom Hornhautabstrich konnten teilweise sehr dicke Hornhaut-Epithelsheets nachgewiesen werden, sowie der Verdacht auf eine Akanthamöben-Zyste gestellt werden. Auf Pilze hingegen war dieser Abstrich negativ. Auch die PCR auf Herpes-simplex-Virus 1 und 2 sowie der bakteriologische Befund auf Akanthamöben konnten kein positives Ergebnis hervorbringen.



*Abbildung 16: Foto in der Spaltlampenuntersuchung präoperativ.  
Die Kornea ist zentral ödematös, mehrere strangförmige Stromatrübungen, keine eindeutigen Dendriten sichtbar.*

Zwei Tage später betrug der BCVA 0,63 (log MAR). Das subjektive Empfinden sowie der Befund der Spaltlampenuntersuchung war unverändert. Als lokale Therapie wurde nun Propamidin 0,1% und PHMB 0,02% stündlich im Wechsel und Moxifloxacin 5mg/ml 5mal täglich gestartet.

In einer erneuten Hornhaut-Kürettage konnten Akanthamöben positiv mittels PCR detektiert werden.

Mitte Jänner wurden anamnestisch weiterhin starke Schmerzen festgestellt. An diesem Tag wurde der Patient zur intensiven topischen Behandlung stationär aufgenommen. In der Spaltlampenuntersuchung zeigte sich weiterhin eine Injektion der Konjunktiva. Das Epithel der Hornhaut war im inferioren Bereich offen und das Stroma vermehrt getrübt.

Zwei Wochen später wurde die Therapie auf Ofloxacin-haltige AT sechsmal täglich, PHMB 0,02% alle zwei Stunden, und Voriconazol 1% AT sechsmal täglich umgestellt. In der Spaltlampenuntersuchung zeigte sich in der Kornea ein geschlossenes Epithel, sichtbare Epithelleisten und eine feine Betauung der temporal-inferioren Hornhaut-Hinterwand.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte keine Regredienz der Erkrankung des linken Auges beobachtet werden. Die durchgeführte systemische und topische Therapie hatte keine Verbesserung gezeigt.

In der konfokalen Mikroskopie wurden Akanthamöben in einer Tiefe von bis zu 188  $\mu\text{m}$  nachgewiesen. Infolgedessen wurde Anfang Februar 2018 eine PTK mit dem Excimer Laser System Zeiss Mel 80™ (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) mit einer Ablationszone von 8,0mm durchgeführt. Die Ablationstiefe betrug zentral nur 80  $\mu\text{m}$  und im temporal-inferioren Hornhautbereich 25  $\mu\text{m}$  mit einer MMC 0,02%-Applikationsdauer von 90 Sekunden. Postoperativ wurde eine therapeutische KL auf die Kornea aufgesetzt. Die topische Therapie wurde nach erfolgreicher Operation mittels Dexamethason und Gentamicin, PHMB 0,02% stündlich und Ofloxacin Augentropfen viermal täglich für drei Tage fortgeführt, danach PHMB auf zwei bis dreistündlich reduziert. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Durchmesser des zentral offenen Hornhautepithels von der durchgeführten PTK 6 mm im Durchmesser.

Eine weitere Woche später im Verlauf wurden die Dexamethason/Gentamicin AT auf einmal täglich herabgesetzt, Voriconazol 1% AT sechsmal täglich der topischen Therapie hinzugefügt und nach sieben Tage konnte es auf viermal täglich reduziert werden.

Fünf Tage später wurde die therapeutische KL gewechselt. Die Hornhaut wies zentral zu diesem Zeitpunkt ein offenes Epithel von der Größe von 1x2 mm auf.

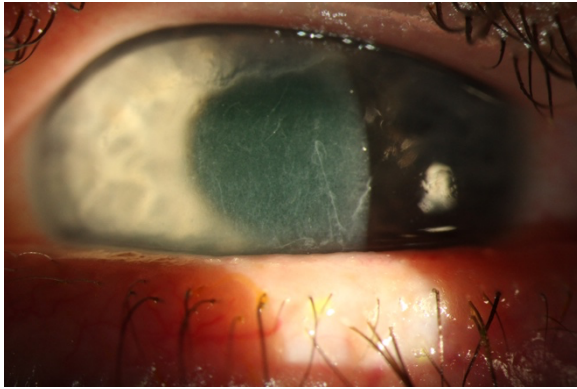
Im März konnten keine Akanthamöben-Zysten mehr in der Hornhaut nachgewiesen werden. Die postoperative Behandlungszeit betrug vier Wochen.



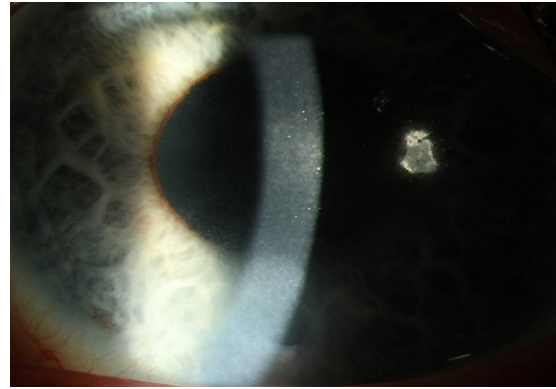
*Abbildung 17: Foto der Kornea 2 Wochen nach erfolgter PTK. Das Hornhautepithel zentral noch minimal offen.*

Subjektiv ging es dem Patienten viel besser. In der Hornhaut war im August 2018 nur noch eine sehr feine Narbe zentral sichtbar.

Der Verlauf wurde für insgesamt zwölf Monate kontrolliert. Der BCVA betrug schließlich 0,1 (log MAR).



*Abbildung 19: 3 Monate nach dem phototherapeutischen Eingriff.*



*Abbildung 18: Foto der Hornhaut in der Spaltlampenuntersuchung nach 12 Monaten. Feine Narbe in der zentralen Hornhaut.*

## 2.5.6 Patientin 6

Diese Patientin war zum Erkrankungsbeginn 61 Jahre alt und wurde erstmals im Juni 2018 mit einer nicht näher bezeichneten Keratitis, die morphologisch Akanthamöben-verdächtig war, am rechten Auge vorstellig. Sie klagte über Schmerzen, Fremdkörpergefühl und hatte subjektiv das Gefühl, als hätte sie ein „feines Häutchen“ im rechten Auge. In der Spaltlampenuntersuchung zeigten sich in der Hornhaut mehrere Infiltrate im nasalen und oberen Bereich, Schwellungen der Nerven mit Umgebungsinfiltraten, ein diffuses Stromaödem und nasal eine Erosion mit 3,2 x 3,2 mm, die vom Abkratzabstrich stammte. Als lokale Therapie wurde mit Ofloxacin AT sechsmal täglich, Gentamicin AS sechsmal täglich sowie Dexamethason/Gentamicin AS abends begonnen.

Anfang Juli konnten sowohl in der PCR-Untersuchung, als auch in der angelegten Kultur aus dem Abkratzabstrich Akanthamöben positiv nachgewiesen werden.

Dementsprechend wurde sofort gehandelt und die topische Therapie auf Ofloxacin AT fünfmal täglich, PHMB 0,02% AT und Propamidin 0,1% AT viertelstündlich im Wechsel umgestellt.

Drei Tage später kam die Patientin erneut mit progredienten Schmerzen und starkem Brennen in die Augenklinik. Die Therapie wurde, wie beschrieben, bis zum Morgen eingenommen und dann nach zunehmender Symptomatik abgesetzt. Im Spaltlampenbefund wurden zusätzlich Descemetfalten beschrieben, ansonsten war der Zustand unverändert. Um die Beschwerden zu lindern wurde die Therapie mit einem Pregabalin 75mg zweimal täglich ergänzt. Auch der mitgebrachte KL-Behälter war bakteriell verunreinigt und mit Pilzen und Akanthamöben-Zysten kontaminiert.

Mitte Juli wurde die topische Therapie etwas modifiziert. PHMB 0,02% AT, sowie Propamidin 0,1% AT wurden auf je achtmal täglich reduziert.

Zusätzlich war an diesem Tag das Tyndall-Phänomen (erhöhter Gehalt an Proteinen durch eine entzündliche Störung der Blut-Kammerwasser-Schranke) in der Vorderkammer des rechten Auges nachweisbar.

Zwei Tage später wurden mit 0,15% Hyaluronsäure-haltige AT fünfmal täglich das Therapieregime ergänzt.

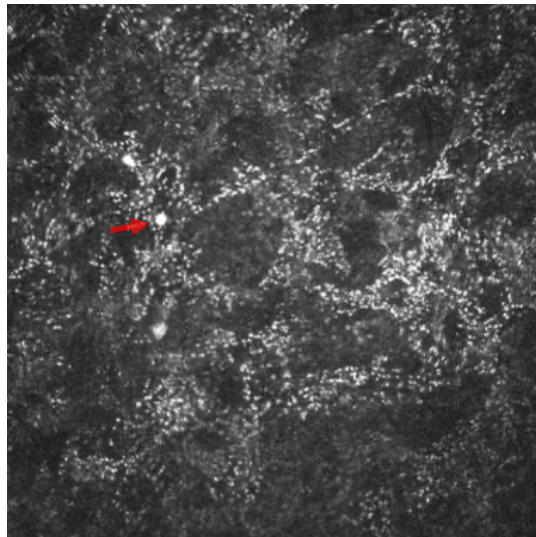
Anfang August zeigte sich in der Spaltlampenuntersuchung weiterhin eine zentrale Erosion und ein Ödem der Hornhaut. Zu diesem Zeitpunkt betrug der BCVA bei zusätzlich trüber

Augenlinse (Katarakt) 0,05 (log MAR). Die topische Therapie wurde auf Ofloxacin viermal täglich, Hydrocortison AT 3,35mg/ml zweimal täglich und PHMB 0,02% AT halbstündlich umgestellt.



*Abbildung 20: Präoperativ zeigte sich in der Spaltlampenuntersuchung unter anderem eine nicht anfärbare, kleine Trübung, ein diffuses Stromaödem und eine Erosion nasal, die vom Abkratzabstrich stammt.*

In der konfokalen Kornealmikroskopie zeigten sich Akanthamöben-Zysten bis in einer Tiefe von 240  $\mu\text{m}$  der Hornhaut.



*Abbildung 21: In der konfokalen Mikroskopie sind Akanthamöben-Zysten (roter Pfeil) zu sehen.*

Nach erfolgloser topischer antimikrobieller Therapie wurde im späten August 2018 mittels dem Excimer Laser System Zeiss Mel 80™ (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) eine PTK durchgeführt. Die Ablationszone betrug 8,0 mm und die Tiefe 100  $\mu\text{m}$ . MMC 0,02% wurde

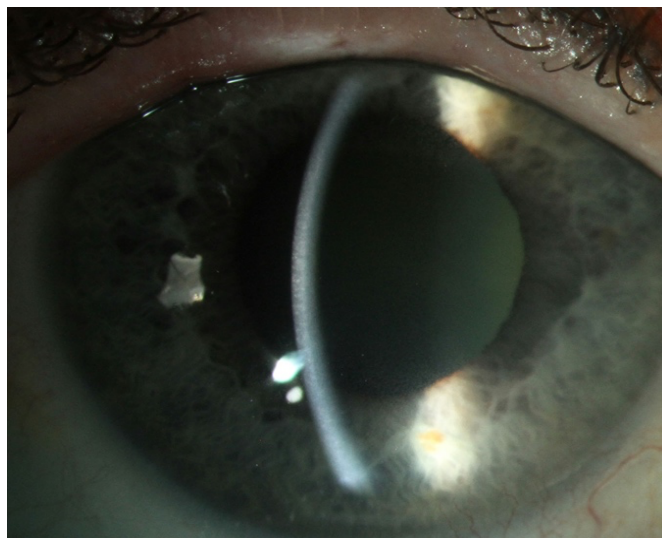
für 60 Sekunden appliziert. Postoperativ wurde das rechte Auge mit einer therapeutische KL bedeckt. Nach der Operation wurde die lokale Therapie mit Hydrocortison AT 3,35mg/ml zweimal täglich und Ofloxacin fünfmal täglich für eine Woche weitergeführt und außerdem Voriconazol 1% AT fünfmal täglich hinzugefügt.

Eine Woche postoperativ wurden mittels konfokaler Mikroskopie Akanthamöben-Zysten bis zu 100 µm im Stroma identifiziert. In der Kontrolluntersuchung nach vier Wochen konnten jedoch in der gesamten Kornea keine Zysten mehr nachgewiesen werden.

Mitte September war in der Spaltlampenuntersuchung ein bereits geschlossenes Epithel der Hornhaut zu erkennen, weswegen Voriconazol 1% AT abgesetzt und anschließend lokal auf PHMB 0,02% AT fünfmal täglich und Hydrocortison 3,35mg/ml zweimal täglich umgestellt wurde.

Der BCVA des rechten Auges betrug drei Monate postoperativ, aufgrund eines noch nicht korrigierbaren unregelmäßigen Epithels und eines grauen Stars (Katarakt), 0,5 (log MAR).

Die Nachuntersuchungszeit bei dieser Patientin umfasste einen Zeitraum von neun Monaten.



*Abbildung 22: Postoperatives Bild der Spaltlampenuntersuchung 6 Monate nach der PTK*

### 3 Ergebnisse

Sechs Patienten mit fortgeschrittener, therapieresistenter Akanthamöbenkeratitis wurden in dieser Studie retrospektiv analysiert. Das Patientenkollektiv bestand aus einer weiblichen Patientin und fünf männlichen Patienten. Das mittlere Alter bei der Operation betrug  $35,8 \pm 15,5$  Jahre. Alle Patienten waren myop und trugen weiche Kontaktlinsen. Bei der Spaltlampenuntersuchung zeigten sich klinische Manifestationen der AK, wie epitheliale und stromale Infiltrate, diffuse, ringförmige Hornhauttrübungen, Erosionen und Ödeme. Fünf Patienten beschrieben massive Hornhautschmerzen. Um die Diagnose der AK zu bestätigen, wurden bei allen Patienten Abstriche der Hornhaut entnommen und mittels Kultur oder der Polymerase-Kettenreaktionstechnik untersucht. Bei zwei der sechs Patienten wurde ein konfokales Mikroskop verwendet, um die Tiefe der Zysten festzustellen.

Nach der gestellten Diagnose umfasste die anfängliche Behandlung bei den Patienten eine Kombination aus topischem Chlorhexidin 0,02% und Propamidin 0,1% (Fall 1, 2, 3) oder Propamidin 0,1% und PHMB 0,02% (Fall 4, 5, 6) in kurzen Intervallen für mindestens eine bzw. bis zu drei Wochen. Dennoch besserten sich die klinischen Symptome nicht und die Infektion verschlechterte sich unabhängig von der topischen Behandlung. In dieser Studie wurden nur Fälle aufgenommen, in denen, nachdem durch die intensive kombinierte medizinische Therapie keine Linderung erzielt wurde, eine PTK durchgeführt wurde.

Die wichtigsten Charakteristika der sechs in dieser Studie eingeschlossenen Augen, wie die Ablationstiefe, postoperative medizinische Behandlungsart und -zeit, Nachbeobachtungszeitraum sowie der prä- und postoperative bestkorrigierte Visus (BCVA) sind in Tabelle 1 dargestellt. Der Zeitraum zwischen der Diagnose der AK und der Durchführung der PTK betrug  $5,8 \pm 1,8$  Wochen. Bei Patienten 5 und 6 lagen konfokale mikroskopische Untersuchungen vor und Akanthamöben-Zysten konnten in einer Tiefe von bis zu 80  $\mu\text{m}$  und 240  $\mu\text{m}$  nachgewiesen werden. Nach Entfernung des Hornhautepithels mit einem Hockeymesser wurde eine PTK mit dem Zeiss Mel 80™ (Fall 1, 2, 3) oder Zeiss Mel 90 (Fall 4, 5, 6) (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) Excimer-Lasersystem durchgeführt; die stromale Ablationstiefe betrug im Mittel  $110,0 \pm 24,5$   $\mu\text{m}$  mit einer optischen Zone von  $7,79 \pm 0,51$  mm. Bei Patienten 1 und 2 wurden infizierte Bereiche in der Hornhautperipherie zusätzlich mit einem Joystick-geführten kleinen Laserstrahl mit einer Spotgröße von 0,7 mm behandelt. In allen Augen wurde direkt nach der Abtragung Mitomycin C (MMC) 0,02% für

90 Sekunden appliziert, und danach für vier Tage eine therapeutische Kontaktlinse eingesetzt. In der Folgezeit wurden die Patienten  $5 \pm 3,3$  Wochen lang mit einer topischen Therapie (Tabelle 1) behandelt. Nach nur einer Anwendung der PTK waren die infizierten Hornhautläsionen in allen Augen verschwunden. In Fall von Patient 6 zeigte die konfokale Mikroskopie nach einer Woche immer noch Akanthamöben-Zysten in einer Tiefe von 100  $\mu\text{m}$  des Stromas, nach vier Wochen waren jedoch keine Akanthamöben-Zysten mehr zu sehen.

In keinen Augen wurde in der Nachbeobachtungszeit ein Rezidiv einer Akanthamöbenkeratitis beobachtet. Bis auf eine peripheren Hornhautnarbe bei einem Patienten (Fall 5), traten keine Komplikationen der Operation auf. Der postoperative BCVA (Logarithmus des minimalen Auflösungswinkels) wurde bei allen Patienten drei Monate nach der Operation mit einer Refraktionsbrille gemessen. Wie in Tabelle 1 dargestellt, hat sich der postoperative BCVA ( $0,27 \pm 0,15$  log MAR) im Vergleich zum präoperativen BCVA ( $0,80 \pm 0,45$  log MAR) deutlich verbessert.

*Tabelle 1 Die wichtigsten Charakteristika der beschriebenen sechs Augen, bei denen eine therapieresistente Akanthamöbenkeratitis vorlag.*

PATIENT	1	2	3	4	5	6
<b>ALTER/ GESCHLECHT</b>	26/M	22/F	48/M	33/M	25/M	61/F
<b>JAHR</b>	2009	2014	2014	2017	2018	2018
<b>ABLATIONS-TIEFE</b>	140 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$	140 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$	80 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$
<b>NACH- BEHANDLUNG</b>	Chlorhexidin 0,02%, Propamidin	PHMB	Tobramycin	Tobramycin	PHMB, Voriconazol	PHMB, Voriconazol
<b>BEHANDLUNGS- ZEIT</b>	6 Wochen	3 Wochen	3 Wochen	3 Wochen	4 Wochen	4 Wochen
<b>DAUER DES FOLLOW-UP</b>	9 Jahre	4 Jahre	28 Monate	6 Monate	12 Monate	9 Monate
<b>PRÄOP. BCVA LOG(MAR)</b>	0,50	1,00	0,50	0,80	0,20	1,0
<b>POSTOP. BCVA LOG(MAR)</b>	0,30	0,10	0,30	0,30	0,10	0,50

## 4 Diskussion

Amöben von der Gattung *Acanthamoeba* sind ubiquitär vorkommende Organismen, die freilebend oder als Parasiten im Gewebe von deren Wirten vorkommen. Infektionen mit Akanthamöben stellen ein schwerwiegendes Risiko für die Gesundheit des Menschen dar und sind charakterisiert durch eine hohe Mortalität, ganz besonders bei immunsupprimierten Individuen. Diese Amöben sind der ätiologische Faktor der granulomatösen Amöbenenzephalitis (GAE) und der Akanthamöbenkeratitis (AK), wo sie nicht selten zu einer Erblindung führen können. Im Übrigen können diese Organismen auch in der Lunge, der Nebennieren, der Nase, dem Hals und den Knochen des Wirtes vorkommen und auch als Vektor von pathogenen Bakterien fungieren. Die Infektion mit Akanthamöben stellt bislang noch ein sehr bedeutendes klinisches Problem dar, im Besonderen durch die noch sehr wenig etablierten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten, die wiederum Folge der noch insuffizient erforschten Pathogenese, Pathophysiologie und der Immunantwort des Wirtes sind. [119]

S. Kilvington et al. [122] beschrieben die Rolle von kontaminiertem Leitungswasser bei Akanthamöbenkeratitiden. Da die Inzidenz der AK in Großbritannien etwa fünfzehnmal höher als in den Vereinigten Staaten und etwa siebenmal höher als in Holland war, wurde das Leitungswasser als potentielle Quelle der AK untersucht. Dabei wurden Proben des Leitungswassers von Häusern von 27 Patientinnen und Patienten mit mittels Kultur diagnostizierter AK entnommen und untersucht. Dabei konnten freilebende Amöben aus einem oder mehreren Wasserhähnen bei 24 (89%) von 27 Haushalten der Patientinnen und Patienten mit diagnostizierter AK festgestellt werden. Das Vorhandensein dieser Organismen variierte stark je nach Temperatur und Lokalisation des Leitungswassers. In 19 (76%) von 25 Badezimmern konnten aus dem kalten Leitungswasser freilebende Amöben detektiert werden, hingegen heißes Leitungswasser war wesentlich seltener, nur in 6 (24%) von 25 Badezimmern, mit diesen Organismen kontaminiert.

Von diesen 27 Patientinnen und Patienten waren 23 (85%) KL-Trägerinnen und Träger, wobei niemand angab seine/ihre KL in Leitungswasser aufzubewahren. Jedoch berichteten alle, außer drei Personen, dass ihre KL-Behälter gelegentlich in Kontakt mit Leitungswasser kämen. Des Weiteren stellten die Autoren fest, dass 24 von 27 Patientinnen und Patienten Wasserspeichertanks auf ihren Dächern hatten. Dadurch konnte erklärt werden, dass die Inzidenz der AK in Großbritannien signifikant höher ist, da vor allem hier

Wasserspeichertanks auf den Dächern verwendet werden, währenddessen in anderen Ländern das Leitungswasser aus Wasserverteilungssystemen kommt. [122]

Im Jahre 1974 wurde zum ersten Mal eine Infektion des Auges mit Akanthamöben, publiziert in der Fachzeitschrift „The Lancet“ von J. Nagington et al. [120], beschrieben. Ein gesunder 32-jähriger Lehrer hatte eine milde, einseitige Keratokonjunktivitis und Uveitis, welche nicht auf eine medikamentöse Behandlung ansprach. Sechs Monate später kam es zu einer progressiven indolenten kornealen Ulzeration, mit Schmerzen und Sehinderung, worauf hin eine Keratoplastik durchgeführt wurde, die jedoch zu einer Transplantatabstoßung führte. Eine frei-lebende Amöbe konnte wiederholt von dem betroffenen Auge isoliert werden - *Acanthamoeba polyphaga*. Bei einem 59-jährigen Landwirt entwickelte sich ein identisches klinisches Bild, bei dem jedoch eine Enukleation, also die Entfernung des betroffenen Auges, nach einem Jahr notwendig wurde. Eine ähnliche Akanthamöbe konnte von dem Gewebe des betroffenen Auges des Landwirts isoliert werden. Diese beiden Fälle sind die ersten Infektionen des Auges mit diesen frei-lebenden, ubiquitär vorkommenden Amöben, die beschrieben wurden. Es dauerte zahlreiche Jahre bis die Ätiologie und Pathogenese dieser Entzündung der Hornhaut geklärt war.

Die wichtigsten Faktoren, welche die Prognose der AK beeinflussen sind zum einen der Schweregrad der Erkrankung zum Zeitpunkt der Präsentation und zum anderen das Intervall zwischen Einsetzen der Symptome und dem Beginn einer effektiven Therapie, wobei das Risiko eines schwereren Verlaufes bei einem Intervall von über drei Wochen stark ansteigt. [121] Die auf die meisten antimikrobiellen Substanzen resistenten Akanthamöben-Zysten machen die AK in der Behandlung zu einer der schwerwiegendsten okularen Infektionen. Die mittlere Behandlungsdauer beträgt mehr als fünf Monate, chirurgische Interventionen sind in 50% der Fälle notwendig, eine Sehinderung von 0,48 (log MAR) oder weniger kommt in 30% der Fälle vor. Als Ultima Ratio kann eine Enukleation in sehr hartnäckigen Fällen notwendig sein. [122]

In Fällen, bei denen die Kombinationstherapie keinen Erfolg brachte, musste als chirurgische Intervention eine Keratoplastik durchgeführt werden, bei der die gesamte Hornhaut (Penetrierende Keratoplastik) oder nur eine schichtweise (Lamelläre Keratoplastik) Transplantation einer Spenderhornhaut vollbracht wird. Die chirurgischen Ergebnisse der meisten dieser Fälle sind zufriedenstellend, bringen jedoch zahlreiche Komplikationen wie

einen irregulären Astigmatismus (Stabsichtigkeit), Transplantatabstoßung, Katarakt oder Glaukom mit sich. [23,66,133]

Kitzmann et al. [113] beschrieben die Resultate der perforierenden (20 Augen) und lamellären (2 Augen) Keratoplastiken bei 22 Patientinnen und Patienten mit therapieresistenter AK im Zeitraum von 1980 bis 2007. Die therapeutische Keratoplastik ist zwar effektiv zur Behandlung von therapieresistenten Akanthamöbenkeratitiden, jedoch sind mehrheitlich (12 Augen; 55%) multiple (2-6) Transplantate notwendig und die Prognose der Sehleistung ist eher zurückhaltend (Median der postoperativen Sehleistung betrug 0.3 (log MAR)). Eine wiederkehrende Keratitis wurde als die am häufigsten (9 Augen; 41%) aufgetretene Komplikation nach einer therapeutischen Keratoplastik beschrieben, die wiederum als Ursache für weitere Komplikationen (persistierende Epitheldefekte und Akanthamöben-Endophthalmitis) gilt, gefolgt von Episoden der Transplantatabstoßung (9 Augen; 41%) und postoperativen Glaukom (7 Augen; 32%).

Eine Arbeitsgruppe aus dem Wills Eye Hospital in Philadelphia kam bei einer retrospektiven Studie [118] auf das Ergebnis, dass sich in den letzten Jahren das gesamte Profil der Patientinnen und Patienten mit AK am Wills Eye Hospital verändert hat. Dabei wurden 59 Patientinnen und Patienten mit AK im Zeitraum von 2009 bis 2015 eingeschlossen und in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 umfasste all jene, die sich mit der Erkrankung zwischen 2009 und 2012 präsentierten und Gruppe 2 umschloss jene von 2013 bis 2015. Diese zwei Gruppen wurden miteinander, bezogen auf Behandlungsergebnis und Charakteristik der Patientinnen und Patienten, verglichen. Dabei kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass sich in den Jahren 2013 bis 2015 ältere Patientinnen und Patienten (31,0 Jahre in Gruppe 1 versus 45,3 Jahre in Gruppe 2) mit viel schwereren Formen der AK präsentierten, die erst viel später Hilfe aufsuchten und eine schlechtere Sehleistung aufwiesen als jene in Gruppe 1. Des Weiteren sind die Behandlungsergebnisse in Gruppe 2 auch schlechter als die der Gruppe 1. [118]

Aufgrund dessen ist der Bedarf an bestmöglich wirksamen Therapiemodalitäten umso größer, da aktuell besonders die schweren und späten Formen der AK in Bezug auf die Therapie sehr hartnäckig erscheinen.

Kombinierte Therapien von topischen Neomycin, Propamidin-Isethionat, Voriconazol, Biguanide (wie das Polyhexamethylenbiguanid), Chlorhexidin und anderen antiamöbischen

Wirkstoffen werden zur Behandlung einer AK empfohlen. Chlorhexidin, Polyhexamethylenbiguanid und Propamidin-Isethionat sind antiseptische Wirkstoffe, die eigentlich als Desinfektionsmittel in Verwendung treten und somit keine spezifische Therapie der AK darstellen. Diese Medikamente sind hilfreich und haben zwar das Potential die Erkrankung in früher Form zu heilen, jedoch blieben diese in unseren Fällen auch bei frühestmöglicher Anwendung ohne Erfolg, besonders dann, wenn sich die Akanthamoeben bereits in ihre Zysten-Form umgewandelt haben. [23,57,54,61,62]

Die PTK hat viele Vorteile bei der Behandlung der AK: mit dem Excimerlaser lassen sich die resistenten Amöben-Zysten und nekrotisches Gewebe direkt entfernen; die Effizienz der medikamentösen Therapie wird gesteigert; die Narbenbildung ist reduziert; die reguläre und sehr sanfte Abtragung der Kornea führt zu einer besseren Erholung des Sehvermögens ohne irregulärem Astigmatismus; die PTK ist eine sicherere Methode im Vergleich zu einer lamellären oder penetrierenden Keratoplastik; die meisten Betroffenen sind myop, weswegen sich nach einer PTK eine Hyperopie als nicht so problematisch darstellt. Jedoch sollte die Ablationstiefe individuell gewählt werden, um die Hornhaut nicht zu stark auszudünnen. [66]

Es konnte gezeigt werden, dass die PTK sehr effektiv im Management von mikrobiellen Keratitiden, verursacht durch Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten, eingesetzt wurde. [66, 114-116] Die meisten bakteriellen Keratitiden sprachen gut auf diese Behandlung an. So führten Lindbohm et al. [114] eine PTK bei einem Patienten mit einer infektiösen Keratitis nach einer Laser-assistierten in situ Keratomileusis (LASIK) in der Schicht nach Anheben des Lappens durch. Die Autoren kamen zu dem Entschluss, dass die PTK in solchen Fällen hilfreich sein könnte, wenn die Infektion nicht auf eine topische bzw. systemische antibiotische Behandlung anspricht. [114]

Eine PTK kann sowohl bei oberflächlichen, als auch tiefen fungalen Infektionen durchgeführt werden. [116] Die Vorteile liegen darin, dass somit die Dauer der Behandlung verkürzt, die Reepithelialisierung beschleunigt werden kann und die Penetration von Medikamenten verbessert wird. Besonders in Fällen mit tiefen Infektionen sollte die medikamentöse Behandlung, wenn notwendig, auch fortgeführt werden. . Die wichtigsten Komplikationen der PTK sind vor allem die Hornhaut-Perforation, weil die infektiöse und ödematöse Kornea eine unterschiedliche Ablationsrate aufweist, das Auftreten eines

irregulären Astigmatismus, eine hyperopische Verschiebung, Haze und Narbenbildung. [116]

Kandori et al. [66] beschrieben vier Fälle von AK, die mittels PTK erfolgreich therapiert wurden, bei denen die Läsionen diffus vorhanden waren und sich auf das obere Drittel beschränkten. Der Vorteil lag darin, dass somit die Zysten direkt entfernt werden konnten. Aufgrund dessen empfehlen die Autoren die frühestmögliche Durchführung der PTK, da die Infektion mit der Zeit tiefer in die Hornhaut vordringt und somit die notwendige gesteigerte Ablationstiefe eine erhöhte Gefahr der Perforation mit sich bringt. Alle vier Patientinnen und Patienten (2 Frauen und 2 Männer; Alter: 46, 37, 22 und 14 Jahre) hatten eine KL-assoziierte AK. Nach der Diagnose haben alle eine Kombinationstherapie mit topischer und systemischer Gabe für mindestens einer Woche erhalten. Anschließend wurde eine PTK durchgeführt, wobei die totale Ablationstiefe  $253,8 \pm 95,3 \mu\text{m}$  betrug und jeweils alle infizierten kornealen Läsionen entfernt wurden. Anschließend konnte keine Progression der Erkrankung mehr festgestellt werden und der postoperative Visus ( $-0,05 \pm 0,06$  (log MAR)) war signifikant besser als der Präoperative ( $1,1 \pm 0,6$  (log MAR)). [66]

Taenaka et al. [117] beschrieben ebenfalls eine mit PTK positiv behandelte Patientin mit einer mit PCR-Test diagnostizierten AK. Auch hier blieb eine topische Therapie mit Antibiotika und Steroiden, dann Chlorhexidin 0,025% und Fluconazol 0,2% zwei-stündlich, einmal täglich Atropin 1%, sowie einmal täglich 100mg Itraconazol per oral ohne Erfolg. Ergänzend dazu wurde auch ein tiefes, korneales Debridement zweimal pro Woche durchgeführt. Drei Wochen nach der oben beschriebenen, erfolglosen Therapie wurde eine transepitheliale PTK mit Ablationstiefe von  $150 \mu\text{m}$  durchgeführt. Der bestkorrigierte Visus lag präoperativ bei 1,54 (log MAR) und postoperativ bei 0,00 (log MAR).

Anhand unserer retrospektiven Fallserie im Zeitraum von 2008 bis 2018 mit sechs Fällen konnte die Effektivität der Applikation von PTK mit MMC 0,02% bei fortgeschrittener AK gezeigt werden, bei denen kein Ansprechen auf das topische Therapieregime verzeichnet werden konnte. Dabei handelt es sich um eine inhomogene Gruppe, da sich in diesem Zeitraum auch die konservative Therapie geändert hat.

Eine PTK wurde nur bei Patientinnen und Patienten durchgeführt, bei denen unter einer medizinischen Therapie die AK voranschritt. Es stellte sich heraus, dass nach durchgeführter PTK mit MMC 0,02% auch Akanthamoeben Zysten, die tiefer in der Hornhaut lagen, als mit

dem Excimerlaser abgetragen wurde, zugrunde gingen. Es erwies sich als hilfreich eine konfokale Mikroskopie vor der PTK durchzuführen, um die Tiefe der Zysten vor der Abtragung zu messen und um den postoperativen Erfolg der Behandlung beurteilen zu können. Eine konfokale Mikroskopie wurde in unserer Fallserie bei zwei Patientinnen und Patienten durchgeführt. Aus den Fallbeschreibungen von Patient 5 und 6 geht hervor, dass die Akanthamöben Zysten in bis zu 188  $\mu\text{m}$  (Fall 5) und bis zu 240  $\mu\text{m}$  (Fall 6) Hornhauttiefe mittels konfokaler Mikroskopie detektiert werden konnten. Die Ablationstiefe betrug bei Patient 5 80  $\mu\text{m}$  und bei Patientin 6 100  $\mu\text{m}$ . Das Interessante ist, dass bei unseren Patientinnen und Patienten, bei denen eine konfokale Mikroskopie zu Verfügung stand, auch noch zehn Tage nach durchgeführter PTK in der konfokalen Mikroskopie Akanthamöben zu sehen waren, nach drei Wochen jedoch waren diese verschwunden und es konnte keine Progredienz der Erkrankung festgestellt werden.

Bezüglich der Visusergebnisse zeigte sich im Vergleich zu einem präoperativen medianen korrigierten Visus von 0,67 log MAR (0,20 – 1,00 log MAR) ein postoperativer korrigierter Visus von 0,27 log MAR (0,10 – 0,50 log MAR). Bei keinen der sechs Fällen traten Komplikationen der PTK auf. Nachdem alle Patientinnen und Patienten dieser Fallserie am betroffenen Auge eine mehr oder weniger starke Myopie aufwiesen haben, wurde die Brechkraft des Auges auch nicht in die Weitsichtigkeit verschoben.

Der ursprüngliche Gedanke für uns war, dass der Excimerlaser, der UV-Licht mit einer Wellenlänge von 193nm erzeugt, die Akanthamöben thermisch entfernt. Allerdings hatten wir auch zwei Fälle in unserer Fallserie, bei denen die Akanthamöben-Zysten tiefer in der Hornhaut lagen, als mit dem Laser abgetragen wurde. Auch diese beiden Fälle konnten erfolgreich mit der PTK geheilt werden.

#### **4.1 Mögliche Hypothesen**

Daraufhin stellten wir folgende Hypothesen auf:

1. Die Akanthamöben-Zysten werden thermisch entfernt, solange sie innerhalb der Ablationstiefe des Excimerlasers liegen. Wenn die Zysten jedoch tiefer liegen als jener Bereich der abgetragen wurde, werden sie nicht thermisch entfernt, sondern es gibt eventuell eine Wirkung durch die gering vorhandene, aber ausreichende Dispersion des Laserlichtes.

2. Durch die Ablation mit dem Excimerlaser wird die Kornea dünner und damit ist die Penetration der topischen Medikamente in die Kornea verbessert. Alle Patientinnen und Patienten unserer Fallserie erhielten eine topische, antiamöbische Nachbehandlung für im Median 3,4 Wochen. Lin et al. [116] haben ebenso berichtet, dass die Penetration von lokalen Medikamenten durch die PTK bei fungalen Keratitiden verbessert wird, wodurch auch tiefe Infektionen, bei denen das gesamte infizierte Gewebe nicht mit dem Excimerlaser abgetragen wurde, geheilt werden konnten.
3. Es könnte auch möglich sein, dass sich die Akanthamöben durch bzw. nach dem Lasern von der Zysten-Form in die aktive, vegetative Trophoziten-Form begeben und somit sensibler auf die medikamentöse Therapie reagieren.
4. Die Zysten der Akanthamöben als inaktive Form variieren in ihrer Größe von 15 bis 30  $\mu\text{m}$ . Durch die Durchführung der PTK könnte die Zysten-Wand zerstört werden, wodurch die Vulnerabilität für das chemotherapeutisch wirksame MMC 0,02%, welches nach der Ablation appliziert wird, ansteigt.

Welcher Mechanismus dahintersteckt, konnte jedoch bislang noch nicht eruiert werden. Unsere laboratorischen Experimente mit Akanthamöben-Kulturen brachten bislang keine fundamentalen Ergebnisse. Das potente Antibiotikum und Zytostatikum Mitomycin C in der Konzentration 0,02% konnte die Akanthamöben-Zysten in unterschiedlichen Versuchen jedoch nicht zum Absterben bringen. Es wurde die unterschiedlich lange Applikation von MMC 0,02% und auch die Verabreichung in unterschiedlichen Intervallen an angelegten Kulturen mit Akanthamöben überprüft. Auch eine intensive Literaturrecherche im PubMed brachte keine Hinweise bezüglich der toxischen Effekten des MMC auf diese nahezu unverwüstlichen Zysten. Weitere umfassende Studien sind notwendig, um den Mechanismus hinter dieser erfolgreichen Behandlung zu erfassen.

## **4.2 Limitationen**

Als Limitationen dieser Arbeit gelten vor allem das gewählte retrospektive Studiendesign, das selbstverständlich der prospektiven Analyse unterlegen ist. Die Aussagekraft dieser Studie ist auch dadurch limitiert, weil die Fallzahl sehr gering ist und dadurch die Anwendung von statistischen Methoden nur sehr eingeschränkt sinnvoll wäre. Da jedoch die AK eine sehr seltene Erkrankung ist und ein Anteil davon mit topischer Therapie erfolgreich behandelt werden kann, bleiben nur wenige Patientinnen und Patienten, an denen das zu untersuchende Therapieregime angewandt werden konnte.

Diese Studie zeigt die Notwendigkeit weiterer, ganz besonders prospektiven cross-over designten Multicenter Studien mit hohen Fallzahlen, um noch genauere Aussagen betreffend der Fragestellung, ob die PTK mit MMC 0,02% bei Patientinnen und Patienten mit therapieresistenter AK die besten Ergebnisse und das schonendste Verfahren im Vergleich zu bisher etablierten Behandlungsmethoden aufweist.

## 5 Konklusion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Durchführung einer phototherapeutischen Keratektomie mit der Applikation von Mitomycin C 0,02% bei Hornhautinfektionen mit Akanthamöben, die nicht auf topische Medikamente ansprechen, eine erfolgsversprechende Therapie darstellt. Dabei wurden jene Fälle im Zeitraum 2009 bis 2018 an der Universitäts-Augenklinik Graz evaluiert und dargestellt. Aufgrund der Tatsache, dass keine spezifische Therapie der Akanthamöbenkeratitis bislang Zulassung gefunden hat und die in Verwendung gebrachten Medikamente meist antiseptische Wirkstoffe sind, ist es unabdinglich eine bestmögliche Alternative im Falle einer Therapieresistenz zu finden.

Auch Daten aus der Literatur von beschriebenen Resultaten von perforierenden und lamellärem Keratoplastiken [113] bei therapieresistenten Fällen der AK zeigten, dass diese Operationstechniken zwar effektiv in der Behandlung der Infektion sind, jedoch mehrheitlich multiple Transplantate aufgrund von Abstoßungsreaktionen notwendig waren, die Prognose der Sehleistung eher eingeschränkt ist und ein Rezidiv der AK eine häufige Komplikation darstellte.

Im Vergleich zu den genannten Operationstechniken konnte in unserer Fallpräsentation zu Tage gebracht werden, dass durch die PTK mit MMC 0,02% in keinem Fall Rezidive oder andere Komplikationen auftraten und auch hinsichtlich der postoperativen Sehleistungen im Vorteil liegt.

Aufgrund der geringen Fallzahl (sechs Augen; zwei Frauen, vier Männer) und das dementsprechend gewählte retrospektive Studiendesign ist die Aussagekraft dieser Studie limitiert. Jedoch sollte diese Studie dazu Anlass geben, weitere, ganz besonders prospektive cross-over designte Multicenter Studien mit hohen Fallzahlen durchzuführen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Anderhuber F, Pera F, Streicher J. Waldeyer – Anatomie des Menschen, 19. Auflage, de Gruyter-Verlag: Berlin/Boston, 2012.
- [2] DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea, J Cataract Refract Surg 2011; 37:588-598.
- [3] Lang G. Augenheilkunde, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 2014.
- [4] Cameron JD. Corneal reaction to injury. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds, Cornea, 2nd ed. Philadelphia, PA, Elsevier Mosby, 2005; 115–133.
- [5] Wiley L, SundarRaj N, Sun T-T, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991; 32:594–602.
- [6] Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SCG. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. Cell Res 2007; 17:26–36.
- [7] Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. Arch Ophthalmol 1961; 65:695–698.
- [8] Bowling B. Kanskis Klinische Ophthalmologie: Ein systematischer Ansatz. 8. Auflage, Elsevier GmbH: München, 2017.
- [9] FiniME, Stramer BM. How the cornea heals; cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. Cornea 2005; 24 (suppl 1):S2–S11.
- [10] Ali M, Raghunathan V, Li JY, Murphy CJ, Thomasy SM. Biomechanical relationships between the corneal endothelium and Descemet's membrane. Exp Eye Res. 2016 November ; 152: 57–70.

- [11] Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:779–782.
- [12] Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985; 4:671–678.
- [13] Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium; effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology* 1985; 92:759–763.
- [14] Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea* 2001; 20:374–384.
- [15] Clarke DW, Niederkorn JY. 2006. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitology*, 22(4), 175–180.
- [16] Khan NA. 2009. *Acanthamoeba – Biology and Pathogenesis*. Caister Academic Press: Norfolk, Great Britain, 290 p
- [17] Khan NA. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 564–595.
- [18] Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 273–307.
- [19] Rocha-Azevedo BD, Jamerson M, Cabral GA, Silva-Filho FC, Marciano-Cabral F. 2009. *Acanthamoeba* interaction with extracellular matrix glycoproteins: biological and biochemical characterization and role in cytotoxicity and invasiveness. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56, 270–278.
- [20] Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), 1–26.

- [21] Visvesvara GS. 2010. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23(6), 590–594.
- [22] Wynter-Allison Z, Lorenzo Morales J, Calder D, Radlein K, Ortega-Rivas A, Lindo JF. 2005. Acanthamoeba infection as a cause of severe keratitis in a soft contact lens wearer in Jamaica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(1), 92–94.
- [23] Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;22:10.
- [24] Cohen EJ, Buchanan HW, Laughrea PA, Adams CP, Galentine PG, Visvesvara GS, Folberg R, Arentsen JJ, Laibson PR. 1985. Diagnosis and management of Acanthamoeba keratitis. *American Journal of Ophthalmology*, 100(3), 389–395.
- [25] Dart JK, Saw VP, Kilvington S. 2009. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *American Journal of Ophthalmology*, 148(4), 487–499.
- [26] Hamburg A, De Jonckheere JF. 1980. Amoebic keratitis. *Ophthalmologica*, 181, 74.
- [27] Lim N, Goh D, Bunce C, Xing W, Fraenkel G, Poole TR, Ficker L. 2008. Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of Acanthamoeba keratitis. *American Journal of Ophthalmology*, 145, 130–135.
- [28] Tu EY, Joslin CE, Sugar J, Shoff ME, Booton GC. 2008. Prognostic factors affecting visual outcome in Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology*, 115, 1998–2003.
- [29] Villani E, Baudouin C, Efron N, Hamrah P, Kojima T, Patel SV, Pflugfelder SC, Zhivov A, Dogru M. 2014. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside. *Current Eye Research*, 39(3), 213–231.
- [30] Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, Mito T, Shiraishi A, Ohashi Y, Higaki S, Itahashi M, Fukuda M, Shimomura Y, Yagita K. 2012. Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of Acanthamoeba and prognosis determinants of Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology*, 119, 1111–1119.

- [31] Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, Wilson ME, Allen RC, Folberg R. 2000. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Archives of Ophthalmology*, 118, 178–183.
- [32] Rivière D, Szczebara FM, Berjeaud JM, Frère J, Héchar Y. 2006. Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 78–83.
- [33] Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. 2001. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1903–1911.
- [34] Garg P, Kalra P, Joseph J. Non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Indian J Ophthalmol* 2017;65:1079-86.
- [35] Tanaka Y, Suguri S, Harada M, et al.: *Acanthamoeba*-specific human T-cell clones isolated from healthy individuals. *Parasitol Res* 1994;80:549 – 553.
- [36] Walochnik J, Scheikl U, Haller-Schober EM. 2014. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2014 July 22.
- [37] Garate M, Cubillos I, Marchant J, Panjwani N. 2005. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. *Infection and Immunity*, 73, 5775–5781.
- [38] Garduño-Vieyra L, González-Sánchez CR, Hernández-Da Mota SE. 2011. Ultraviolet-a light and riboflavin therapy for *Acanthamoeba* keratitis: a case report. *Case Reports in Ophthalmology*, 2(2), 291–295.
- [39] Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Kim KS, Stins M, Khan NA. 2004. *Acanthamoeba* induces cell-cycle arrest in the host cells. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 711–717.

- [40] Sissons J, Kim KS, Stins M, Jayasekera S, Alsam S, Khan NA. 2005. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Infection and Immunity*, 73, 2704–2708.
- [41] Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rDNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45, 45–54.
- [42] Tripathi T, Abdi M, Alizadeh H. 2013. Role of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitors in attenuating apoptosis of the corneal epithelial cells and mitigation of *Acanthamoeba keratitis*. *Experimental Eye Research*, 113, 182–191.
- [43] Khan NA. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 564–595.
- [44] Brooks SE, Schneider DL. 1985. Oxidative metabolism associated with phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Protozoology*, 32, 330–333.
- [45] Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, Wilson ME, Allen RC, Folberg R. 2000. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba keratitis* using polymerase chain reaction analysis. *Archives of Ophthalmology*, 118, 178–183.
- [46] Pellegrin JL, Ortega-Barria E, Barza M, Baum J, Pereira ME. 1991. Neuraminidase activity in *Acanthamoeba* species trophozoites and cysts. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 32, 3061–3066.
- [47] Van Klink F, Alizadeh H, Stewart GL, Pidherney MS, Silvany RE, He Y, McCulley JP, Niederkorn JY. 1992. Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba keratitis*. *Current Eye Research*, 11, 1207–1212.
- [48] Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Abreu-Acosta N, Ballart D, Martínez E, Valladares B. 2005. RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine

proteases genes in *Acanthamoeba*: Molecular analysis and effect on pathogenicity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 144, 10–15.

[49] Mattana A, Cappai V, Alberti L, Serra C, Fiori PL, Cappuccinelli P. 2002. ADP and other metabolites released from *Acanthamoeba castellanii* lead to human monocytic cell death through apoptosis and stimulate the secretion of proinflammatory cytokines. *Infection and Immunity*, 70, 4424–4432.

[50] Hurt, M. et al. (2003) Effects of mannose on *Acanthamoeba castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3424–3431

[51] Cho JH, Na BK, Kim TS, Song CY. 2000. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *IUBMB Life*, 50, 209–214.

[52] Pérez-Serrano J, Martínez J, Pérez B, Bernadina WE, Rodríguez-Caabeiro F. 2000. In vitro shock response to different stressors in free living and pathogenic *Acanthamoeba*. *International Journal of Parasitology*, 30(7), 829–835.

[53] Pettit DA, Williamson J, Cabral GA, Marciano-Cabral F. 1996. In vitro destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. *Journal of Parasitology*, 82, 769–777.

[54] Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. 2013. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in Parasitology*, 29(4), 181–187.

[55] Mazur T, Hadas E, Iwanicka I. 1995. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Tropical Medicine and Parasitology*, 46, 106–108.

[56] Beattie TK, Tomlinson A, McFadyen AK, Seal DV, Grimason AM. 2003. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? *Ophthalmology*, 110, 765–771.

- [57] Zegans ME, Becker HI, Budzik J, O'Toole G. 2002. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA and Cell Biology*, 21, 415–420.
- [58] Clarke DW, Niederkorn JY. 2006. The immunobiology of Acanthamoeba keratitis. *Microbes and Infection*, 8(5), 1400–1405.
- [59] Walochnik J, Obwaller A, Haller-Schober EM, Aspöck H. 2001. Anti-Acanthamoeba IgG, IgM, and IgA immunoreactivities in correlation to strain pathogenicity. *Parasitology Research*, 87(8), 651–656.
- [61] Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Machin RP, López-Arencibia A, García-Castellano JM, de Fuentes I, Loftus B, Maciver SK, Valladares B, Piñero JE. 2013. Inhibition of HMG-CoA reductase and the application of statins as a novel effective therapeutic approach against Acanthamoeba infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 375–381.
- [62] Roberts CW, Henriquez FL. 2010. Drug target identification, validation, characterisation and exploitation for treatment of Acanthamoeba (species) infections. *Experimental Parasitology*, 126, 91–96.
- [63] Blackman HJ, Rao NA, Lemp MA, Visvesvara GS. 1984. Acanthamoeba keratitis successfully treated with penetrating keratoplasty: suggested immunogenic mechanisms of action. *Cornea*, 3, 125.
- [64] Cohen EJ, Parlato CJ, Arentsen JJ, Genvert GI, Eagle RC Jr, Wieland MR, Laibson PR. 1987. Medical and surgical treatment of Acanthamoeba keratitis. *American Journal of Ophthalmology*, 103(5), 615–625.
- [65] Parthasarathy A, Tan DT. 2007. Deep lamellar keratoplasty for Acanthamoeba keratitis. *Cornea*, 26(8), 1021–1023.
- [66] Kandori M, Inoue T, Shimabukuro M, Hayashi H, Hori Y, Maeda N, Tano Y. 2010. Four cases of Acanthamoeba keratitis treated with phototherapeutic keratectomy. *Cornea*, 29(10), 1199–1202.

[67] Von Talos, colorized by Jakov - copied from German Wikipedia, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3321021>

[68] Santhiago MR, Netto MV, Wilson SE. Mitomycin C: biological effects and use in refractive surgery. *Cornea* 2012 Mar;31(3):311-321.

[69] Hata T, Hoshi T, Kanamori K, et al. Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. I. *J Antibiot.* 1956;9:141–146.

[70] Shiraha Y, Sakai K, Teranaka T. Clinical trials of mitomycin C, a new antitumor antibiotic; preliminary report of results obtained in 82 consecutive cases in the field of general surgery. *Antibiot Annu.* 1959;6: 533–540.

[71] Wakaki S. Recent advance in research on antitumor mitomycins. *Cancer Chemother Rep.* 1961;13:79–86.

[72] Islaih M, Halstead BW, Kadura IA, et al. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat Res.* 2005;578:100–116.

[73] Mladenov E, Tsaneva I, Anachkova B. Activation of the S phase DNA damage checkpoint by mitomycin C. *J Cell Physiol.* 2007;211:468–476.

[74] Majmudar PA, Forstot SL, Dennis RF, Nirankari VS, Damiano RE, Brenart R, et al. Topical mitomycin-C for subepithelial fibrosis after refractive corneal surgery. *Ophthalmology* 2000 Jan;107(1):89-94.

[75] Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, et al. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chem Rev.* 2005; 105:739–758.

[76] Fujita T, Tamura T, Yamada H, et al. Pharmacokinetics of mitomycin C (MMC) after intraperitoneal administration of MMC-gelatin gel and its anti-tumor effects against sarcoma-180 bearing mice. *J Drug Target.* 1997; 4:289–296.

- [77] Reddy MV, Randerath K. 32P-analysis of DNA adducts in somatic and reproductive tissues of rats treated with the anticancer antibiotic, mitomycin C. *Mutat Res.* 1987; 179:75–88.
- [78] Warren AJ, Maccubbin AE, Hamilton JW. Detection of mitomycin C-DNA adducts in vivo by 32P-postlabeling: time course for formation and removal of adducts and biochemical modulation. *Cancer Res.* 1998;58: 453–461.
- [79] Verweij J, Pinedo HM. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs.* 1990;1:5–13.
- [80] Pritsos CA, Sartorelli AC. Generation of reactive oxygen radicals through bioactivation of mitomycin antibiotics. *Cancer Res.* 1986;46: 3528–3532.
- [81] Pogrebniak HW, Matthews W, Pass HI. Chemotherapy amplifies production of tumor necrosis factor. *Surgery.* 1991;110:231–237.
- [82] Goeptar AR, Groot EJ, Scheerens H, et al. Cytotoxicity of mitomycin C and Adriamycin in freshly isolated rat hepatocytes: the role of cytochrome p450. *Cancer Res.* 1994;54:2411–2418.
- [83] Talamo JH, Gollamudi S, Green WR, De La Cruz Z, Filatov V, Stark WJ. Modulation of corneal wound healing after excimer laser keratomileusis using topical mitomycin C and steroids. *Arch Ophthalmol* 1991 Aug;109(8):1141-1146.
- [84] Abraham LM, Selva D, Casson R, et al. Mitomycin: clinical applications in ophthalmic practice. *Drugs.* 2006;66:321–340.
- [85] Akarsu C, Onol M, Hasanreisoglu B. Effects of thick Tenon's capsule on primary trabeculectomy with mitomycin-C. *Acta Ophthalmol Scand.* 2003;81:237–241.
- [86] Oguz H. Mitomycin C and pterygium excision. *Ophthalmology.* 2003; 110:2257–2258.

- [87] Lee JS, Oum BS, Lee SH. Mitomycin C influence on inhibition of cellular proliferation and subsequent synthesis of type I collagen and laminin in primary and recurrent pterygia. *Ophthalmic Res.* 2001;33: 140–146.
- [88] Watanabe J, Sawaguchi S, Fukuchi T, et al. Effects of mitomycin C on the expression of proliferating cell nuclear antigen after filtering surgery in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997;235:234–240.
- [89] Pinilla I, Larrosa JM, Polo V, et al. Subconjunctival injection of low doses of mitomycin C: effects on fibroblast proliferation. *Ophthalmologica.* 1998;212:306–309.
- [90] Netto MV, Mohan RR, Ambrosio R Jr, et al. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea.* 2005;24:509–522.
- [91] Shah RA, Wilson SE. Use of mitomycin-C for phototherapeutic keratectomy and photorefractive keratectomy surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2010 Jul;21(4):269-273.
- [92] Netto MV, Mohan RR, Sinha S, Sharma A, Dupps W, Wilson SE. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res* 2006 May;82(5):788-797.
- [93] Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, et al. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res.* 1997;65:575–589.
- [94] Mohan RR, Kim WJ, Mohan RR, et al. Bone morphogenic proteins 2 and 4 and their receptors in the adult human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:2626–2636.
- [95] Wilson SE, He YG, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res.* 1996;62:325–327.
- [96] Mohan RR, Mohan RR, Kim WJ, et al. Modulation of TNF-alpha induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kb. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:1327–1334.

- [97] Wilson SE, Chen L, Mohan RR, et al. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res.* 1999;68:377–397.
- [98] Tuominen IS, Tervo TM, Teppo AM, et al. Human tear fluid PDGF-BB, TNF-alpha and TGF-beta1 vs corneal haze and regeneration of corneal epithelium and subbasal nerve plexus after PRK. *Exp Eye Res.* 2001;72: 631–641.
- [99] Jester JV, Huang J, Petroll WM, et al. TGF beta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF beta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res.* 2002;75:645–657.
- [100] Zieske JD, Guimaraes SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res.* 2001; 72:33–39.
- [101] Wilson SE. Molecular cell biology for the refractive corneal surgeon: programmed cell death and wound healing. *J Refract Surg.* 1997;13: 171–175.
- [102] Helena MC, Baerveldt F, Kim W-J, et al. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:276–283.
- [103] Shah SS, Kapadia MS, Meisler DM, et al. Photorefractive keratectomy using the summit SVS Apex laser with or without astigmatic keratotomy. *Cornea.* 1998;17:508–516.
- [104] Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis. *J Biol Chem.* 2003;278:45629–45637.
- [105] Siganos DS, Katsanevaki VJ, Pallikaris IG. Correlation of subepithelial haze and refractive regression 1 month after photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg.* 1999;15:338–342.
- [106] Netto MV, Mohan RR, Sinha S, et al. Effect of prophylactic and therapeutic mitomycin C on corneal apoptosis, cellular proliferation, haze, and long-term keratocyte density in rabbits. *J Refract Surg.* 2006; 22:562–574.

- [107] Wilson SE, Chaurasia SS, Medeiros FW. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response. *Exp Eye Res.* 2007;85:305–311.
- [108] Wilson SE, Marino GK, Medeiros CS, et al. Phototherapeutic keratectomy: science and art. *J Refract Surg.* 2017;33:203–210.
- [109] Ayres BD, Rapuano CJ. Excimer laser phototherapeutic keratectomy. *Ocular Surf.* 2006;4:196-206.
- [110] Fagerholm P. Phototherapeutic keratectomy: 12 years of experience. *Acta Ophthalmol Scand.* 2003;81:19-32.
- [111] Thompson VM. Excimer laser phototherapeutic keratectomy: clinical and surgical aspects. *Ophthalmic Surg Lasers.* 1995;26:461-472.
- [112] Kohnen T (2011) Refraktive Chirurgie [E-Book]. Berlin: Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-05406-8.
- [113] A. S. Kitzmann, K. M. Goins, J. E. Sutphin und M. D. Wagoner, „Keratoplasty for Treatment of Acanthamoeba Keratitis,“ *American Academy of Ophthalmology*, Nr. 116, pp. 864-869, 2009.
- [114] Lindbohm N, Moilanen JA, Vesaluoma MH, Tervo TM. Acinetobacter and Staphylococcus aureus ulcerative keratitis after laser in situ keratomileusis treated with antibiotics and phototherapeutic keratectomy. *J Refract Surg.* 2005;21(4):404–406.
- [115] Fagerholm P, Ohman L, Orndahl M. Phototherapeutic keratectomy in herpes simplex keratitis. Clinical results in 20 patients. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1994;72(4):457–460. doi:10.1111/j.1755-3768.1994.tb02796.x
- [116] Lin CP, Chang CW, Su CY. Phototherapeutic keratectomy in treating keratomycosis. *Cornea.* 2005;24(3):262–268. doi:10.1097/01.ico.0000148313.78933.68

- [117] Taenaka N, Fukuda M, Hibino T, et al. Surgical therapies for Acanthamoeba keratitis by phototherapeutic keratectomy and deep lamellar keratoplasty. *Cornea*. 2007;26(7):876–879. doi:10.1097/ICO.0b013e318074b385
- [118] Roozbahani M, Hammersmith KM, Rapuano CJ, Nagra PK, Zhang QE, Siu SY. Acanthamoeba Keratitis: Are Recent Cases More Severe?. *Cornea*. 2018;37(11):1381–1387. doi:10.1097/ICO.0000000000001640
- [119] Kot K, Łanocha-Arendarczyk NA, Kosik-Bogacka DI. Amoebas from the genus Acanthamoeba and their pathogenic properties. *Ann Parasitol*. 2018;64(4):299–308. doi:10.17420/ap6404.164
- [120] Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet*. 1974;2(7896):1537–1540. doi:10.1016/s0140-6736(74)90285-2
- [121] Dart JK, Saw VP, Kilvington S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(4):487–499.e2. doi:10.1016/j.ajo.2009.06.009
- [122] Kilvington S, Gray T, Dart J, et al. Acanthamoeba keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(1):165–169. doi:10.1167/iovs.03-0559
- [123] Seal DV. Acanthamoeba keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye (Lond)*. 2003;17(8):893-905. doi:10.1038/sj.eye.6700563
- [124] Acharya NR, Lietman TM, Margolis TP. Parasites on the rise: a new epidemic of Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2007;144(2):292-293. doi:10.1016/j.ajo.2007.06.026
- [125] Butler TK, Males JJ, Robinson LP, et al. Six-year review of Acanthamoeba keratitis in New South Wales, Australia: 1997-2002. *Clin Exp Ophthalmol*. 2005;33(1):41-46. doi:10.1111/j.1442-9071.2004.00911.x

[126] Szentmáry, N., Daas, L., Shi, L., Laurik, K. L., Lepper, S., Milioti, G., & Seitz, B. (2018). Acanthamoeba keratitis - Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *Journal of current ophthalmology*, 31(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.joco.2018.09.008>