



HAL
open science

Traitements médicamenteux de la kératite amibienne : revue de la littérature

Erwin Lenglet

► **To cite this version:**

Erwin Lenglet. Traitements médicamenteux de la kératite amibienne : revue de la littérature. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-04314108

HAL Id: dumas-04314108

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04314108v1>

Submitted on 29 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

UFR DE PHARMACIE

Année : 2022

N°

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 29 septembre 2022

par

Erwin LENGLET

TRAITEMENTS MEDICAMENTEUX DE LA KERATITE AMIBIENNE : REVUE DE LA LITTERATURE

Directeur de thèse : **M. Philip CHENNELL**

Jury :

Président : **Mme Valérie SAUTOU**

Professeur, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres : **M. Philip CHENNELL**

Maître de conférences,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Mme Céline Nourrisson

Maître de conférences,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

M. Mathieu Wasiak

Praticien hospitalier,
CHU de Clermont-Ferrand

Remerciements

Je tenais à remercier tout d'abord Mme le Professeur Valérie Sautou pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je la remercie sincèrement pour sa qualité d'écoute et sa disponibilité.

Un merci tout particulier au Dr Philip Chennell pour avoir accepté de m'encadrer pour cette thèse. Il a su me guider et m'orienter lorsque j'en avais besoin. C'est la raison pour laquelle je souhaitais travailler avec lui et bénéficier de son expérience et sa pédagogie.

Un grand merci au Dr Mathieu Wasiak qui m'a également beaucoup aidé tout au long de mes stages au CHU. Il a su faire de moi un pharmacien plus efficace et plus aguerri, j'ai beaucoup de chance d'avoir pu travailler avec lui.

Merci au Dr Céline Nourrisson d'avoir pris du temps pour moi et pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire de parasitologie. Ces conseils se sont révélés précieux.

Je remercie les pharmaciens du CHU de Clermont-Ferrand qui m'ont encadré au cours de mon internat et m'ont fait confiance depuis mon stage de FFI au CHU Estaing. Ils m'ont permis d'apprécier mon travail et de progresser dans l'exercice de la Pharmacie.

Pour l'équipe de l'UPCO du Centre Jean Perrin : un grand merci pour m'avoir fait débiter l'internat dans les meilleures conditions. Attention, je reviens bientôt...

Merci à l'équipe du CH Emile Roux du Puy en Velay. Ce retour en Haute-Loire m'a laissé de très bons souvenirs.

Un grand merci aux internes Clermontois pour ces moments passés au 2B, en soirée, ou sur le terrain.

Un merci tout particulier à mes co-internes Clermontois qui ont su rendre mes stages plus agréables, et m'aider en cas de besoin : Murielle, Marie S., Marie M., Pauline, Manon, Romain, Coralie et Agnès.

Merci à mes amis : Aymeric, Axel, Charly, Guillaume, Hamza, Jérôme, Khaled, Marc, Mickael

Pierre, Simon, Thomas A., Thomas M., Tristan. Les années d'études n'auraient pas eu la même saveur sans eux et j'ai beaucoup de chance de pouvoir compter sur leur bonne humeur et leur aide en toute circonstance. Je n'oublie pas également tous ceux qui ont participé à la création de souvenirs inoubliables pendant ces années.

Merci à ma famille, qui a cru en mes objectifs et m'a soutenu tout au long de mes études.

Merci à Inès, pour sa douceur et sa bienveillance. Son soutien est inestimable et j'espère en être digne.

Enfin, merci à ceux qui ne sont plus là. Je sais qu'ils auraient été très fiers de moi aujourd'hui.

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	4
Liste des abréviations.....	6
Index des figures.....	7
Index des tableaux.....	7
Préambule.....	8
Bibliographie: le traitement de la kératite à <i>Acanthamoeba</i>	9
I. Agent pathogène.....	9
1. Les amibes.....	9
2. <i>Acanthamoeba spp.</i> : description.....	9
3. Taxonomie.....	10
4. Epidémiologie.....	12
II. Physiopathologie de la kératite amibienne.....	13
1. Anatomie de la cornée.....	13
2. Adhésion à l'épithélium cornéen.....	14
3. Invasion de l'épithélium cornéen.....	14
4. Dégradation du stroma cornéen.....	15
5. Symptômes.....	16
III. Diagnostic.....	16
1. Diagnostic clinique et microscopie confocale <i>in vivo</i>	16
2. Examen direct et culture.....	17
3. PCR.....	17
4. Biopsie cornéenne.....	17
IV. Traitements.....	18
1. Traitements chirurgicaux.....	18
a. Débridement épithélial.....	18
b. Kératoplastie ou greffe de cornée.....	18
c. Enucléation.....	19
2. Traitements médicamenteux.....	19
a. Les biguanides.....	19
b. Les diamines.....	20
c. La corticothérapie locale.....	21
d. Autres molécules d'intérêt.....	21

V. Problématiques.....	22
Méta-analyse	23
Discussion générale.....	41
I. Synthèse des résultats.....	41
II. Discussion des résultats	41
III. Limites du travail expérimental.....	42
IV. Contexte local et ouverture.....	43
Conclusion	45
Références bibliographiques	46
Annexe 1	53

Liste des abréviations

AAC :	Autorisation d'accès compassionnel
AMM :	Autorisation de mise sur le marché
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomal
CLX :	Chlorhexidine
KA :	Kératite amibienne
MGG :	May-Grünwald Giemsa
MIP 133 :	Protéine induite par le mannose 133
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase
PHMB :	Polyhexaméthylène biguanide
PUI :	Pharmacie à usage intérieur
<i>Spp.</i> :	<i>Species pluralis</i>
UV :	Ultra-violets

Index des figures

Figure 1. Cycle biologique de <i>Acanthamoeba spp.</i>	9
Figure 2: Forme trophozoïte (A) et kystique (B) d' <i>Acanthamoeba spp.</i> dotée d'une double paroi caractéristique.	10
Figure 3: Classification simplifiée des amibes.	11
Figure 4: Anatomie de la cornée.	14
Figure 5: Physiopathologie de l'invasion et de la destruction de la cornée.....	15
Figure 6: Infiltration du stroma cornéen lors d'une KA.	16
Figure 7: forme trophozoïte (à gauche) et kystique (à droite) d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> après coloration au MGG et grossissement X100.	17
Figure 8: kit de grattage de la cornée, avec les différents milieux de culture pour le diagnostic microbiologique, les lames porte-objet pour l'examen direct, un tube Eppendorf® pour réaliser la PCR à <i>Acanthamoeba</i> et un milieu de transport viral.	18
Figure 9: principe de la kératoplastie.	19
Figure 10. Molécule de chlorhexidine (A) et monomère de polyhexaméthylène biguanide (B).....	20

Index des tableaux

Tableau I: Classification morphologique des espèces d' <i>Acanthamoeba</i>	12
---	----

Préambule

Acanthamoeba spp. est un genre d'amibe ubiquitaire et saprophyte, que l'on retrouve fréquemment dans l'eau. Ces amibes sont des protozoaires opportunistes responsables de kératites amibiennes (KA) aux conséquences potentiellement graves. La première description d'une KA date de 1974, et son incidence ne cesse d'augmenter face à l'amélioration du diagnostic et au port de lentilles de contact de plus en plus fréquent dans les pays développés. Elles peuvent entraîner une perte d'acuité visuelle et d'importantes douleurs, nécessitant parfois une énucléation en dernier recours. Il est donc nécessaire de les diagnostiquer le plus tôt possible et de les traiter efficacement.

Les signes cliniques de la KA étant peu spécifiques et les formes kystiques de l'amibe étant extrêmement résistantes, il s'agit d'une pathologie difficile à prendre en charge. Il n'existe aucun traitement ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans cette indication. Empiriquement, les molécules les plus souvent utilisées en collyres sont la chlorhexidine (CLX) ou le polyhexaméthylène biguanide (PHMB) associés ou non à l'hexamidine ou la propamidine.

Devant un certain nombre de problématiques comme le manque de données cliniques, le risque de résistance au traitement et la rupture d'approvisionnement de certaines matières premières, nous proposons de faire une synthèse des différents traitements possibles, en rapport avec les données récentes de la littérature scientifique. Ensuite nous proposons une méta-analyse à partir de patients atteints de KA et traités par PHMB et CLX. Enfin, dans une dernière partie, nous proposerons une discussion de nos résultats et une ouverture par rapport au contexte local.

Bibliographie: le traitement de la kératite à *Acanthamoeba*

I. Agent pathogène

1. Les amibes

Les amibes sont des protozoaires (eucaryotes unicellulaires) capables de se déplacer grâce à leurs pseudopodes. Il existe deux types d'amibes en fonction de leur habitat : les amibes libres et les amibes parasites. Les amibes parasites, par opposition aux amibes libres, ont besoin d'un hôte pour vivre et se multiplier. On retrouve des amibes parasites dans le tube digestif des humains. Certains peuvent se révéler pathogènes comme *Entamoeba histolytica* qui peut entraîner des amibiases intestinales par destruction de la muqueuse intestinale. Les amibes libres sont des protozoaires saprophytes et ubiquitaires responsables de pathologies opportunistes chez les immunodéprimés (encéphalites amibiennes granulomateuses à *Acanthamoeba*) ou non opportunistes (méningoencéphalites à *Naegleria fowleri* et kératites à *Acanthamoeba*) (1). La Figure 1 décrit le cycle biologique d'*Acanthamoeba spp.*.

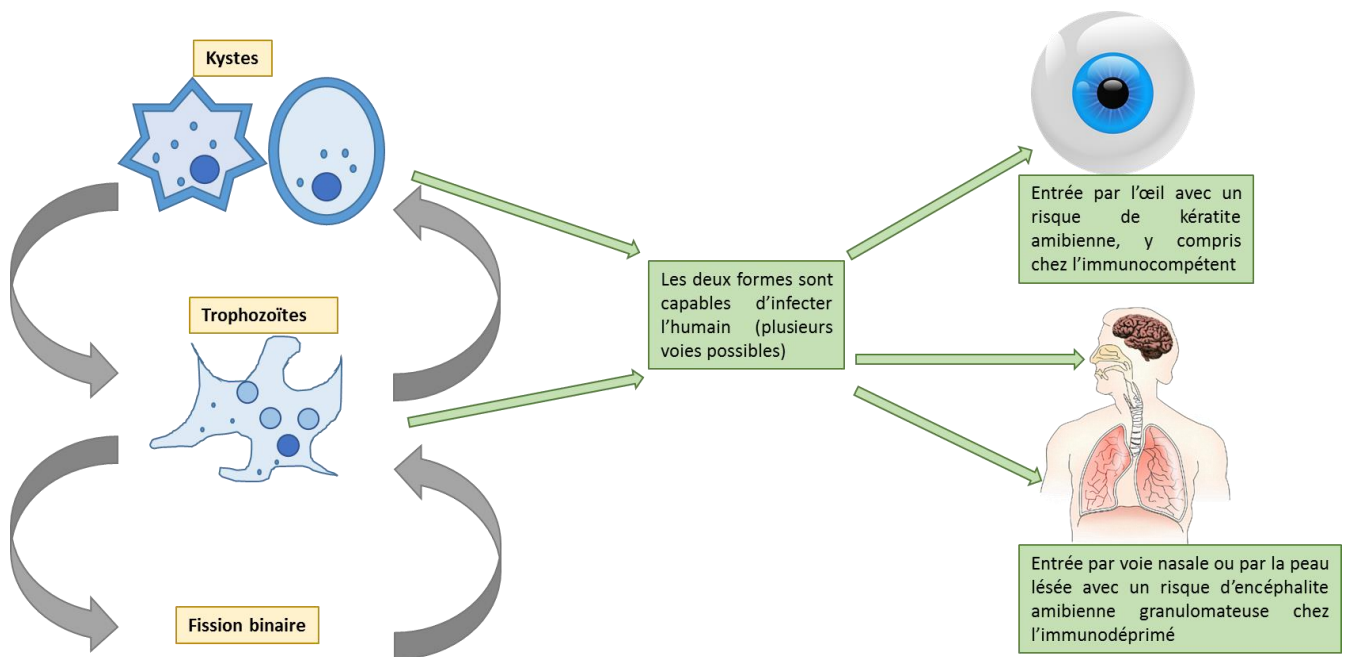


Figure 1. Cycle biologique de *Acanthamoeba spp.*. D'après Lenglet et al.

2. *Acanthamoeba spp.*: description

Comportant une membrane plasmique composée de protéines, phospholipides et stérols, *Acanthamoeba* possède également une vacuole contractile qui lui permet de réguler la pression

osmotique du cytoplasme ainsi qu'une vacuole digestive (2,3). En outre, elle possède un noyau qui renferme le matériel génétique et des pseudopodes qui lui permettent de se déplacer (4). *Acanthamoeba* est le genre d'amibe libre le plus représenté dans notre environnement (5). Son cycle biologique comprend un stade trophozoïte et un stade kystique (1) représentés Figure 2. La forme trophozoïte, qui mesure entre 20 et 40 μm , est la forme qui se nourrit d'autres microorganismes (levures, bactéries, autres protozoaires, cellules humaines, matière organique) et qui assure le déplacement de l'amibe et sa multiplication par fission binaire. La forme kystique est la forme quiescente de l'amibe, qui mesure entre 5 et 20 μm . Elle constitue la forme de résistance de l'amibe grâce à une épaisse double paroi (6), permettant de résister à des pH et des températures extrêmes, à un environnement pauvre en nutriments, mais également à de nombreux désinfectants et anti-infectieux. L'amibe peut passer d'une forme à une autre en fonction des conditions environnementales (1,7,8).



Figure 2: Forme trophozoïte (A) et kystique (B) d'*Acanthamoeba* spp. dotée d'une double paroi caractéristique. Barre d'échelle = 10 μm . Reproduit de (9).

3. Taxonomie

On retrouve les amibes dans plusieurs lignées parmi les eucaryotes. Le genre *Acanthamoeba* appartient à la classe *Discosea* du phylum *Amoebozoa* (10). La Figure 3 représente la classification simplifiée des amibes dans le domaine des eucaryotes.

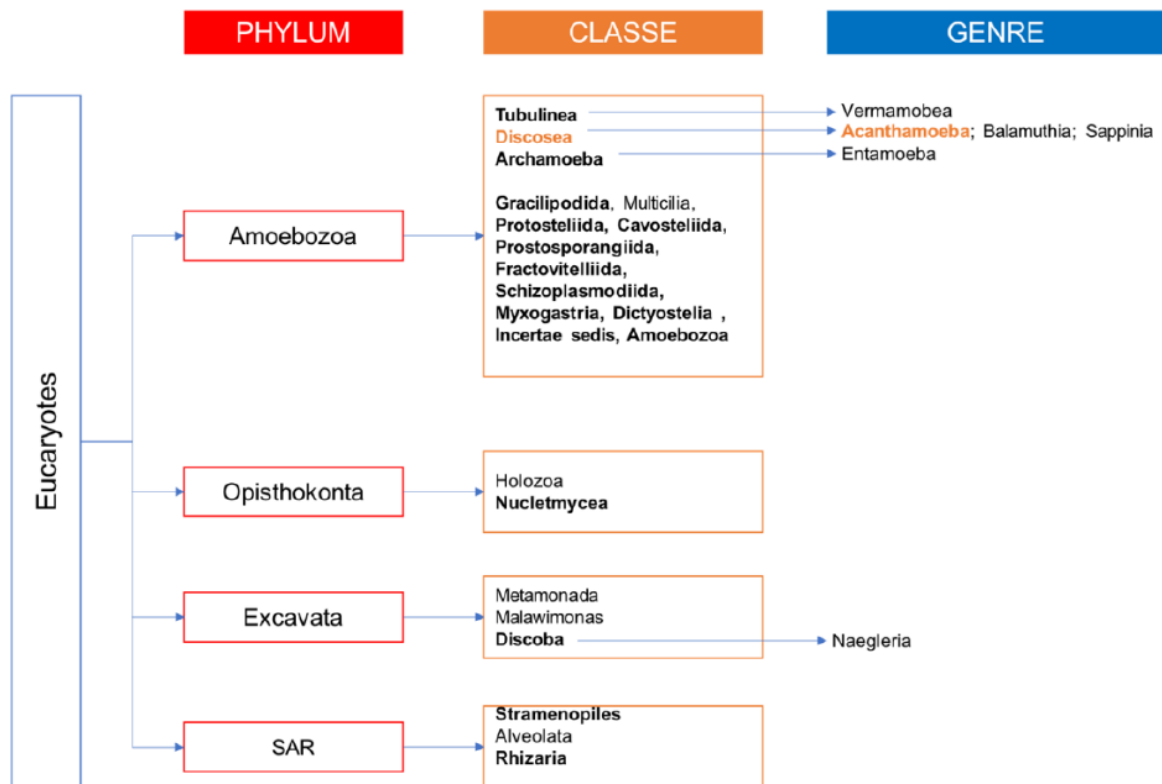


Figure 3: Classification simplifiée des amibes. Reproduit de (11).

L'identification des différentes espèces du genre *Acanthamoeba* est difficile. Il existe une vingtaine d'espèces réparties en 3 groupes selon des critères morphologiques des kystes (12). Ces groupes sont décrits dans le Tableau I. Le groupe I concerne des espèces formant des kystes de grande taille, de diamètre supérieur à 18 µm. Le groupe II comprend les espèces formant des kystes de diamètre inférieur à 18 µm et de forme irrégulière. Il regroupe la plupart des espèces responsables de KA, dont *A. castellanii* et *A. polyphaga*. Le groupe III concerne les espèces formant des kystes de diamètre inférieur à 18 µm. Cette classification présente des limites : en effet, la morphologie des kystes peut varier en fonction des conditions de culture.

Des techniques de biologie moléculaire permettent une identification bien plus spécifique et plus sensible. Une classification plus récente et fondée sur l'étude du gène de l'ARNr de la sous-unité 18S (5), a permis l'identification de 12 génotypes (T1 à T12) grâce à l'hybridation in situ. Les génotypes T7, T8 et T9 correspondent aux espèces du groupe I. Les génotypes T3, T4, T11 correspondent aux espèces du groupe II. Enfin, les génotypes T1, T2, T5, T6, T10 et T12 correspondent aux espèces du groupe III. Les kératites amibiennes sont reliées au génotype T4 dans 90 % des cas. Le génotype T4 est également celui qui est le plus répandu dans l'environnement (13).

Tableau I: Classification morphologique des espèces d'*Acanthamoeba*. Reproduit de (12).

Groupe morphologique	Nom des espèces
Groupe I	<i>A. astronyxis</i> <i>A. comandoni</i> <i>A. echinulata</i> <i>A. tubiashi</i>
Groupe II	<i>A. castellanii</i> <i>A. mauritaniensis</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. lugdunensis</i> <i>A. quina</i> <i>A. rhyodes</i> <i>A. divionensis</i> <i>A. paradivionensis</i> <i>A. griffini</i> <i>A. triangularis</i> <i>A. hatchetti</i>
Groupe III	<i>A. palestinensis</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. pustulosa</i> <i>A. royreba</i>

4. Epidémiologie

Décrite pour la première fois en 1974 (14), l'incidence de la KA ne cesse d'augmenter devant l'amélioration du diagnostic ainsi que l'augmentation de la fréquence du port de lentilles de contact dans les pays développés. En effet, les KA concernent des patients porteurs de lentilles de contact dans près de 90 % des cas (15–17). Il peut s'agir de lentilles souples ou rigides, destinées à un usage thérapeutique (lentilles d'orthokératologie), optique ou esthétique. Un défaut d'entretien des lentilles (utilisation d'eau du robinet, utilisation d'un produit de désinfection périmé, lavage des mains insuffisant) est également un facteur de risque. Cependant, malgré l'absence de défaut d'entretien, l'apparition de KA est possible. En effet, les solutions de désinfection pour lentilles ne sont pas testées sur les formes kystiques de toutes les espèces pathogènes, les KA étant considérées comme des infections trop rares. En outre, une étude *in vitro* a montré l'inefficacité de certaines

solutions commerciales sur les formes trophozoïtes, mais également sur les kystes (18). C'est en été et au début de l'automne que l'incidence des KA augmente devant l'augmentation de la pratique de sports nautiques et la présence plus importante d'*Acanthamoeba* dans l'environnement lors de l'augmentation des températures (19).

Pour les patients non porteurs de lentilles de contact, les KA peuvent être consécutives à un traumatisme de la cornée (chirurgie, accident), à une exposition tellurique (artisans, agriculteurs), ou à une exposition à de l'eau contaminée (piscine non entretenue, eau stagnante) (20).

Il n'existe pas de données épidémiologiques en France mais le taux d'incidence était de 0,15 cas par million d'habitants aux Etats-Unis dans les années 80 et de 1,4 cas par million d'habitants au Royaume-Uni à la fin des années 90. Cet écart peut s'expliquer par le système d'alimentation d'eau Britannique, où l'eau est stockée dans des réservoirs au lieu d'être acheminée directement jusqu'à son point d'utilisation (8,21–25). Une étude plus récente publiée en 2019 montre que l'incidence de la KA a augmenté de 20 % par année aux Pays-Bas entre 2009 et 2016, atteignant 2,9 cas par million d'habitants (19). En 2018, une étude montre également une augmentation de l'incidence en Nouvelle-Zélande entre 2001 et 2016. Entre 2001 et 2009, l'incidence moyenne était de 0,84 cas par million d'habitants par an puis cette incidence est passée à 1,8 cas par million d'habitants par an entre 2009 et 2016 (26). Devant ces chiffres, on peut donc estimer le nombre de cas de KA en France à environ 200 par an.

II. Physiopathologie de la kératite amibienne

La kératite se définit comme une inflammation de la cornée, membrane qui recouvre la partie antérieure de l'œil, devant l'iris et la pupille. Elle peut être d'origine infectieuse, traumatique ou toxique.

1. Anatomie de la cornée

La Figure 4 représente l'anatomie de la cornée, membrane transparente et innervée qui permet le passage de la lumière vers la rétine. Son diamètre horizontal est de 12 mm et son diamètre vertical est de 11 mm. Son épaisseur centrale est de 550 µm. Avec le cristallin, elle est responsable du pouvoir réfractif de l'œil. Ils permettent la modification de la trajectoire du rayon lumineux, afin de le faire converger vers la rétine. La cornée et le cristallin sont avasculaires, et c'est cette particularité qui leur donne cette transparence. L'apparition d'une néovascularisation concerne des événements pathologiques, dont les kératites infectieuses (27), et peut entraîner un déficit visuel.

La cornée est constituée de 5 couches de tissus :

- L'épithélium cornéen qui est constitué de 5 à 7 couches de cellules épithéliales non kératinisées.
- La membrane de Bowman constitue une fine couche de tissu conjonctif.

-Le stroma cornéen représente 90 % de l'épaisseur de la cornée. Il est composé de kératocytes et de collagène organisé en lamelles.

-La membrane de Descemet est une fine couche séparant le stroma de l'endothélium. Cette membrane s'épaissit tout au long de la vie.

-L'endothélium cornéen représente une seule couche de cellules, séparées de l'iris par l'humeur aqueuse.

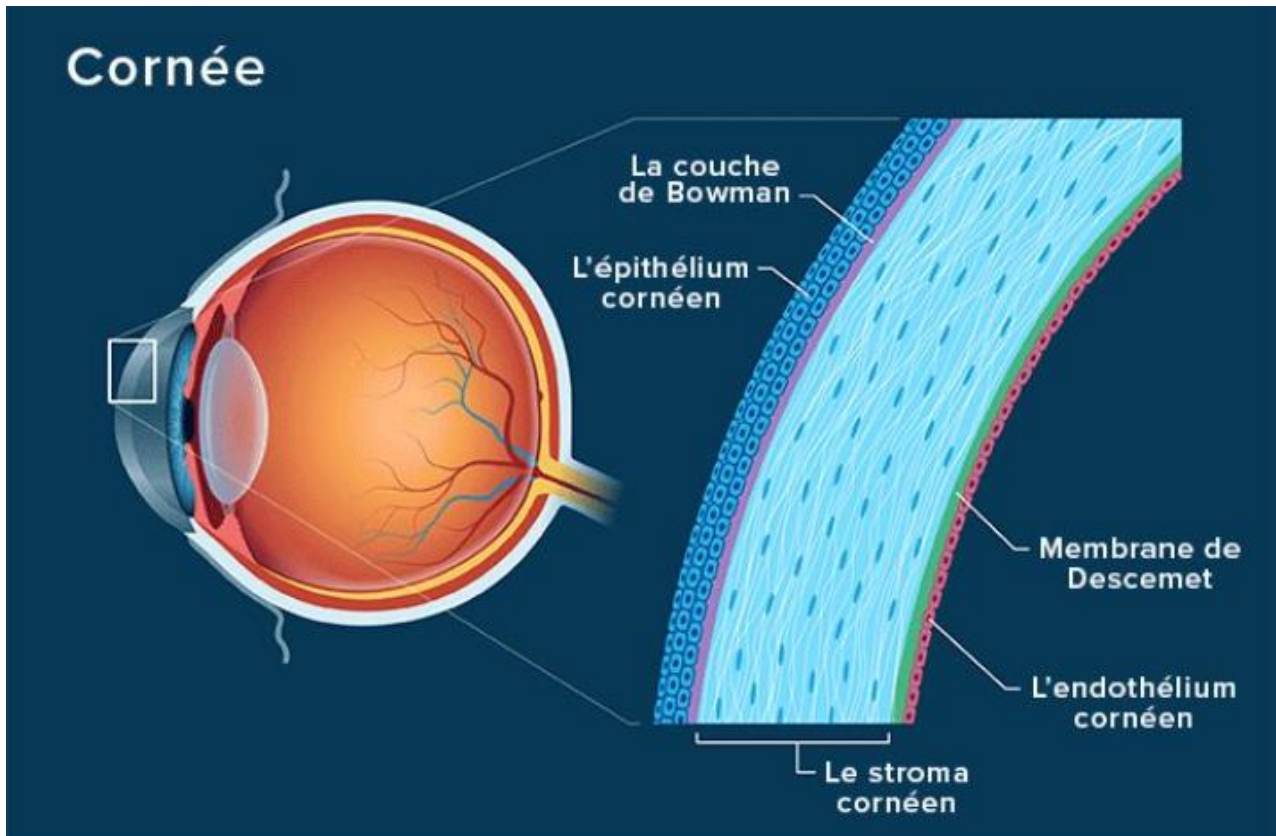


Figure 4: Anatomie de la cornée. Reproduit de (28).

2. Adhésion à l'épithélium cornéen

L'adhérence des trophozoïtes est provoquée par l'expression d'une mannose-binding-protein au niveau de leur membrane cellulaire. Cette protéine va se lier aux glycoprotéines mannosylées de l'épithélium cornéen. En cas d'abrasion de cet épithélium (par exemple lors de port de lentilles de contact), l'expression des glycoprotéines mannosylées est augmentée, entraînant de ce fait une augmentation de l'adhérence des trophozoïtes sur la cornée (29).

3. Invasion de l'épithélium cornéen

L'adhésion des trophozoïtes à l'épithélium cornéen est suivie d'une dégradation de l'épithélium et

de la membrane de Bowman avant d'accéder au stroma. L'amibe est capable de phagocyter les cellules épithéliales mais également d'induire leur apoptose et de provoquer une cytololyse grâce à la production de protéases, dont MIP133 (15,29).

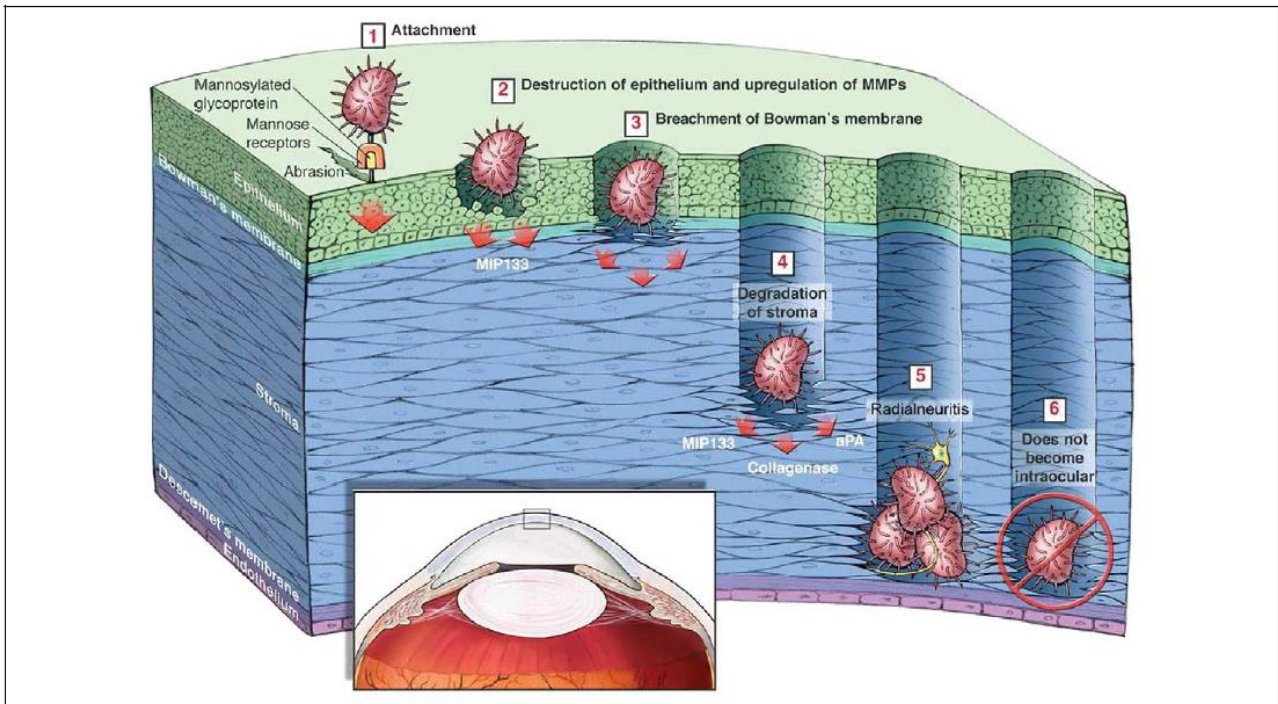


Figure 5: Physiopathologie de l'invasion et de la destruction de la cornée. Reproduit de (29).

4. Dégradation du stroma cornéen

Les protéinases produites par les trophozoïtes entraînent une dissolution du stroma cornéen (29) ainsi qu'une dégradation des cellules nerveuses cornéennes. La destruction des cellules nerveuses provoque une périnévrite radiaire, ce qui pourrait expliquer la douleur intense lors de l'infection. La périnévrite est pathognomonique de la KA, mais inconstante. Des débris cellulaires peuvent persister dans le stroma et entretenir l'inflammation (30).

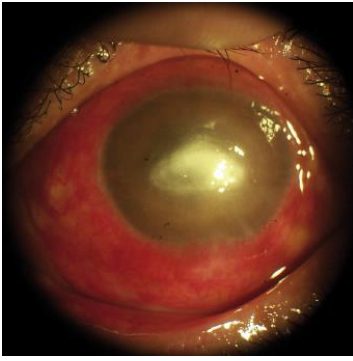


Figure 6: Infiltration du stroma cornéen lors d'une KA. Reproduit de (31).

5. Symptômes

Les patients atteints de KA se plaignent de douleur intense, de photophobie, d'une sensation de corps étranger, d'un ptosis ou de troubles de la vue (8,9,16,32) bien que ces signes cliniques ne soient pas toujours présents (33). Les symptômes sont généralement unilatéraux bien qu'environ 5 % des KA concernent des atteintes bilatérales (16).

La KA peut se compliquer d'une co-infection bactérienne ou fongique (8), d'une cataracte, d'une atrophie de l'iris et de glaucome . Elle peut également conduire à une cécité définitive et nécessiter une énucléation pour soulager les douleurs du patient (34).

III. **Diagnostic**

1. Diagnostic clinique et microscopie confocale *in vivo*

Le diagnostic de la KA est compliqué du fait des signes cliniques non spécifiques. Elle est souvent confondue à tort avec la kératite herpétique, beaucoup plus fréquente (35), notamment chez les patients non porteurs de lentilles de contact. La fluorescéine est généralement utilisée pour mettre en évidence les lésions comme les infiltrats péri-neuraux, les ulcérations, ou encore les hypopyons (36) à l'aide d'une lampe à fente (37).

La microscopie confocale *in vivo* est une technique non invasive ayant une spécificité et une sensibilité supérieures à 90 % (38). Elle permet l'identification des kystes amibiens avec leur double paroi caractéristique. Cependant, cette double paroi n'est pas toujours présente et rend plus difficile le diagnostic. La microscopie confocale permet également de retrouver des nerfs élargis, caractéristiques de kératonévrite radiaire, une complication de la KA (8).

2. Examen direct et culture

Le diagnostic repose essentiellement sur un grattage de cornée et la mise en culture. Après grattage de la cornée à l'aide d'une lame de bistouri, un examen direct au microscope optique permet l'observation des formes kystiques et trophozoïtes après coloration au MGG. La mise en culture du prélèvement se fait généralement sur une gélose d'agar-agar sans nutriments recouverte d'une suspension de bactéries Gram négatif inactivées qui seront phagocytées par *Acanthamoeba*. Lorsque les nutriments viennent à manquer au bout de quelques jours, des formes kystiques apparaissent (9,39,40).

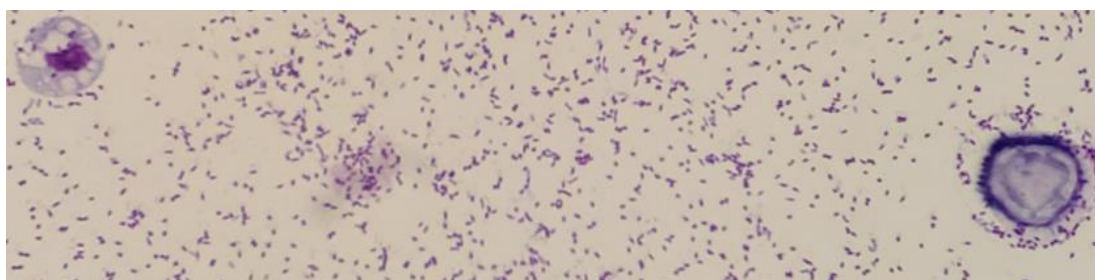


Figure 7: forme trophozoïte (à gauche) et kystique (à droite) d'*Acanthamoeba castellanii* après coloration au MGG et grossissement X100. Crédits image Service de parasitologie, CHU Clermont-Ferrand.

3. PCR

On peut mettre en évidence l'ARNr 18S de *Acanthamoeba* (9,41) par amplification génomique grâce à la PCR. Le résultat est plus rapide par rapport à la mise en culture (5 jours en moyenne contre 10 avec la culture) et la spécificité est de 100 % mais la sensibilité est inférieure à celle de l'examen direct. Il est possible d'augmenter la sensibilité en combinant plusieurs PCR. De plus, il existe un risque de faux-négatif si le grattage de la cornée est trop superficiel (8) ou en cas de présence de molécules inhibitrices pour la PCR. La fluorescéine, utilisée pour l'examen de la cornée et l'oxybuprocaine, utilisée comme anesthésique locale, peuvent inhiber la PCR et la détection d'ARN d'*Acanthamoeba*. C'est pour cela qu'il est recommandé de rincer l'œil du patient avec du sérum physiologique avant le prélèvement. Enfin, le résultat peut différer en fonction des amorces utilisées pour la PCR (42).

4. Biopsie cornéenne

En cas d'échec des autres techniques, il est parfois nécessaire de recourir à la biopsie cornéenne, méthode plus invasive qui permet un prélèvement plus important et plus profond (43). Elle est

parfois utilisée pour réaliser le diagnostic de certitude. Toutefois, cette technique entraîne souvent une cicatrisation opaque néovascularisée qui peut donc entraîner une perte d'acuité visuelle (44).

IV. Traitements

1. Traitements chirurgicaux

a. Débridement épithélial

Utilisé dans les stades précoces de kératite infectieuse, il correspond au pelage de l'épithélium cornéen. Le débridement épithélial permet de réduire la charge parasitaire tout en améliorant la pénétration des collyres anti-amibiens (8). L'épithélium recueilli peut également servir à réaliser des examens complémentaires. Cette technique est peu efficace sur les formes sévères.



Figure 8: kit de grattage de la cornée, avec les différents milieux de culture pour le diagnostic microbiologique, les lames porte-objet pour l'examen direct, un tube Eppendorf® pour réaliser la PCR à *Acanthamoeba* et un milieu de transport viral. Reproduit de (43).

b. Kératoplastie ou greffe de cornée

Par le passé, les greffes de cornées ont été largement pratiquées en cas de kératite amibienne avancée. Aujourd'hui, elles sont indiquées en cas de perforation cornéenne mais le traitement médicamenteux doit être poursuivi. Cependant, elles sont de moins en moins employées face au risque de récurrence et au rejet de greffe en cas de néovascularisation. Le seul traitement efficace reste l'administration de collyres anti infectieux. On réalise aujourd'hui des kératoplasties une fois

l'infection guérie en cas de troubles de la vision persistants suite aux séquelles cornéennes (8).

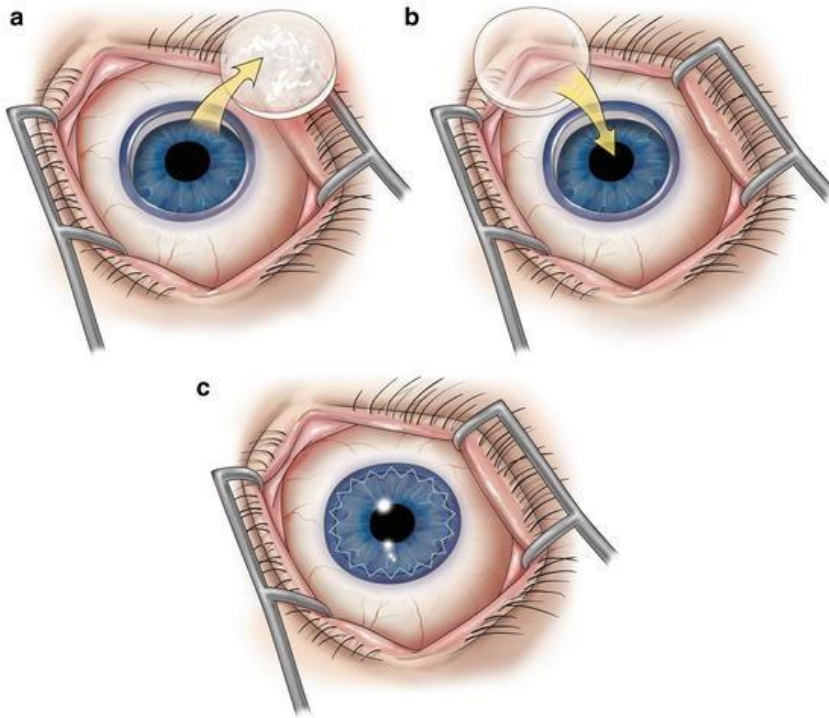


Figure 9: principe de la kératoplastie. Reproduit de (45).

c. Enucléation

Utilisée en dernier ressort, l'ablation du globe oculaire fait suite à un échec médicamenteux suivi généralement de plusieurs kératoplasties (16,35,38). Cette technique permet de soulager le patient des douleurs provoquées par la kératonévrite.

2. Traitements médicamenteux

Actuellement, les traitements prescrits en première intention concernent les collyres de biguanides de diamines. C'est pourquoi nous nous intéresserons plus spécifiquement à ces deux classes de molécules aux propriétés anti infectieuses.

a. Les biguanides

Les biguanides sont des agents désinfectants cationiques parmi lesquels on trouve le PHMB et la CLX. Le premier cas décrit de KA traitée par PHMB l'a été en 1992 (46). La première utilisation clinique d'un collyre à la chlorhexidine a été décrite en 1994 (47). Ces deux molécules possèdent une action à la fois sur les formes trophozoïtes et sur les formes kystiques (48–51), en altérant la membrane cytoplasmique des amibes et induisant une lyse cellulaire pour la CLX ou une apoptose

pour le PHMB (52). En pratique courante, les collyres de biguanides sont utilisés à la concentration de 0,02 % soit 200 µg/mL avec une efficacité clinique satisfaisante (16,35,53–55). Une étude *in vitro* a démontré une moindre efficacité kysticide quand les collyres sont utilisés à la concentration 0,002 % (51). Une étude randomisée en double aveugle a montré une efficacité comparable de ces 2 molécules utilisée à 0,02 % (55), mais le trop faible nombre de patients inclus ne permet pas de donner une conclusion définitive. A l'initiation, l'administration a lieu généralement toutes les heures, y compris la nuit pendant 48 à 72 heures, ce qui nécessite une hospitalisation. La fréquence d'administration est parfois de 2 fois par heure jour et nuit à l'initiation du traitement, en fonction du protocole. Ensuite, l'administration a lieu toutes les heures pendant 72 heures en journée seulement. Enfin, pour minimiser la toxicité, les collyres sont administrés 4 fois par jour pendant plusieurs mois, jusqu'à élimination des formes kystiques et trophozoïtes d'*Acanthamoeba*. Il n'y a pas de consensus défini concernant la durée du traitement qui dure souvent plus de 6 mois voire 1 an dans certains cas (56,57).

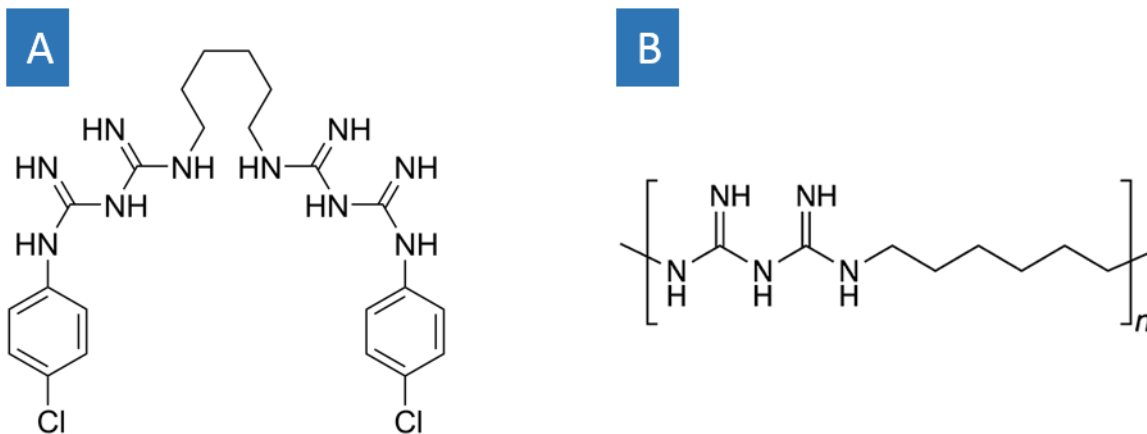


Figure 10. Molécule de chlorhexidine (A) et monomère de polyhexaméthylène biguanide (B). Reproduit de (58,59).

b. Les diamines

Les diamines généralement utilisées sont la propamidine 0,1 % (soit 1 mg/mL) et l'hexamidine 0,1 %. Ces molécules possèdent des propriétés antibactériennes mais leur mécanisme reste méconnu. En France, il existe une spécialité à base d'hexamidine di-isethionate, Désomédine®. Au Royaume-Uni, il existe une spécialité à base de propamidine isethionate (Brolene®), disponible en France uniquement sous AAC. Une étude a montré une efficacité supérieure de l'hexamidine *in vitro* par rapport à la propamidine (60) qui a présenté une certaine toxicité (61). Les diamines sont généralement utilisées en association avec un biguanide (56), l'activité kysticide des diamines étant insuffisante et nécessitant des concentrations élevées en monothérapie pour être efficace (51). Des

études récentes tendent à montrer que l'utilisation de biguanide en monothérapie est aussi efficace qu'en association avec une diamine mais incluent trop peu de patients traités par chlorhexidine pour conclure quant à l'intérêt des diamines dans la prise en charge de la KA (35,62).

c. La corticothérapie locale

Ils peuvent s'avérer efficaces en cas de douleurs intense ou d'ulcères cornéens, mais il est recommandé d'attendre 2 semaines de traitement efficace par biguanide avant de les administrer. Cela permet d'éliminer un maximum de forme trophozoïtes et kystiques. Généralement, la prednisolone 0,5 % est administrée 4 fois par jour. En cas d'inflammation insuffisamment contrôlée, il est parfois nécessaire de recourir à la dexaméthasone 0,1 % à une fréquence variable en fonction des signes cliniques (63). Une alternative possible pour traiter l'inflammation et la douleur est le flurbiprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien (64). Cependant, l'administration locale de corticoïdes est décriée, car l'effet immunosuppresseur de ceux-ci pourrait s'avérer délétère pour le patient et entraîner une prolifération des amibes. Une étude rétrospective sur 41 patients traités par biguanides, propamidine, corticoïdes et Neosporin® entre 1999 et 2006 a montré la supériorité du traitement par biguanides et tend à exclure les corticoïdes du traitement (65).

d. Autres molécules d'intérêt

Le voriconazole est un antifongique triazolé qui agit en inhibant la synthèse d'ergostérol, composant essentiel de la membrane d'*Acanthamoeba*. Les études sont contradictoires concernant l'efficacité du voriconazole : des études *in vitro* ont montré une efficacité sur les formes trophozoïtes (48,66) tandis qu'une autre étude *in vitro* a mis en évidence que les deux formes d'*Acanthamoeba* (trophozoïte et kystique) étaient résistantes (51). De plus, une étude clinique a révélé une efficacité similaire entre le collyre de voriconazole 1 % et les collyres de biguanides (67). Il peut être administré localement (68) ou *per os* (69). Cependant, trop peu de patients ont été traités par cette molécule pour conclure définitivement quant à sa place dans l'arsenal thérapeutique. C'est pourquoi il est utilisé en deuxième ligne en cas d'inefficacité du traitement par biguanide. L'itraconazole, un autre antifongique triazolé administré *per os*, semble moins efficace que le voriconazole et les biguanides sur les formes kystiques (48).

Pour le clotrimazole, le fluconazole et le kétoconazole, antifongiques imidazolés, il n'a pas été mis en évidence que ces molécules avaient une efficacité sur les formes kystiques *in vitro*, elles ne sont donc pas recommandées en monothérapie (50,64).

La Caspofungine, antifongique de la classe des échinocandines, a montré une efficacité à la fois sur les formes trophozoïtes et kystiques dans une étude *in vitro* (70). Cependant, elle n'est pas utilisée

en clinique.

La miltéfosine est un alkyl-lysophospholipide, molécule utilisée comme antinéoplasique dans certains cancers du sein mais également comme anti-parasitaire pour traiter la leishmaniose. Habituellement administrée en collyre ou *per os*, elle est cependant de moins en moins utilisée à cause d'une toxicité locale et systémique importante, sans compter un effet tératogène (71,72).

La néomycine, antibiotique de la classe des aminosides, a démontré une efficacité *in vitro* à la fois sur les kystes et les formes trophozoïtes. Cependant, elle peut entraîner une toxicité épithéliale et des réactions d'hypersensibilité qui rendent difficile son utilisation en clinique. La néomycine a été peu à peu abandonnée devant une efficacité clinique médiocre, une toxicité constatée ainsi qu'un risque de résistance (46,56,64,73). Il en va de même pour les autres antibiotiques de la classe des aminosides comme l'amikacine, la gentamicine ou la paromomycine (50).

Neosporin®, un mélange d'antibiotiques contenant de la néomycine, de la polymyxine B et de la gramicidine, est une spécialité qui a souvent été utilisée en association pour traiter la KA (74–76). Toutefois, il n'existe pas d'étude clinique pour évaluer son efficacité en monothérapie. De plus, comme vu précédemment, la néomycine a montré une efficacité médiocre et une toxicité importante. Neosporin® a donc été peu à peu abandonné.

Il existe également une molécule de structure proche de la CLX et utilisée comme antiseptique : la picloxydine dont la spécialité Vitabact® est disponible en France à la concentration de 0.05%. Cette molécule peu utilisée dans la KA a démontré son intérêt dans une étude clinique (77).

La povidone-iodine à la concentration 0,1 % ou 1 % a montré une efficacité *in vitro* sur les formes trophozoïtes et kystiques *in vitro* mais son efficacité clinique n'a pas été démontrée (51).

Parmi les plantes, une étude *in vitro* et *in vivo* sur des souris a révélé une efficacité de l'huile d'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) à la fois sur les kystes et les trophozoïtes avec une faible toxicité (78). Néanmoins, les données cliniques sont insuffisantes pour en faire un traitement de référence.

La thérapie photo-dynamique appelée *cross-linking* consiste à administrer un collyre à la riboflavine 0,1 % suivi d'une exposition environ 30 minutes à des rayons UV-A. Son utilisation s'est révélée efficace pour plusieurs patients (79). Cependant, devant le faible nombre de patients traités avec cette méthode, aucune garantie sur son efficacité ne peut être admise.

V. Problématiques

Les kystes d'*Acanthamoeba spp.* sont résistants à de nombreuses molécules et les biguanides sont les seules molécules ayant démontré la meilleure efficacité pour traiter la KA (49). L'émergence de résistance à cette classe de molécules s'avère gravissime pour le patient avec un risque d'impasse thérapeutique (80).

En pratique, les biguanides sous forme de collyre font partie du traitement de première intention concernant la KA. Cependant, il n'existe pas de spécialité commerciale ayant l'AMM dans cette indication. Les collyres de PHMB ou CLX doivent donc être préparés dans une PUI à partir de matière première à usage pharmaceutique. Néanmoins, devant le manque de données dans la littérature, il est difficile de sélectionner une molécule plus qu'une autre.

La concentration du collyre prescrit représente également un problème car si la concentration retenue est de 200 µg/mL dans la majorité des cas dans la littérature, il est difficile de justifier cette concentration à cause du manque de données. Les collyres de biguanides sont généralement bien tolérés.

Si le manque de données concernant leur efficacité pose question pour privilégier une des deux molécules, il en est de même concernant la toxicité. L'analyse de la tolérance oculaire de la CLX, utilisée comme conservateur dans les solutions de désinfection pour lentilles de contact, a montré qu'elle augmentait la perméabilité de la cornée en affectant son intégrité. De plus, elle peut entraîner des réactions allergiques de contact, des rougeurs et une photophobie. Une concentration élevée en CLX (4 %) peut induire des lésions cornéennes, un œdème, une desquamation ou encore un retard de cicatrisation. De même, une faible concentration en CLX (0,005 %) peut provoquer une légère irritation et des opacifications cornéennes (81–84). Le PHMB était classé carcinogène de classe 2 par la Commission Européenne mais le Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs a décidé que son utilisation était sans risque pour une concentration allant jusqu'à 0,1 % (85,86). Néanmoins, il peut provoquer des irritations oculaires et cutanées prouvées par des études sur des rats (87) et décrites lors de son utilisation en clinique (67).

Méta-analyse

Dans le but de répondre en partie aux problématiques posées, un travail a été réalisé sous forme d'un article original à soumettre au journal *Microorganisms* (Editeur MDPI, IF₂₀₂₁ : 4.926).

Acanthamoeba keratitis treatment by biguanide eye drops: a meta-analysis

Abstract: *Acanthamoeba* keratitis is a rare and serious infection requiring biguanide eye drops to be cured. In order to determine which molecule is to be preferred between chlorhexidine and polyhexanide, we realized a meta-analysis using the PRISMA methodology, including case reports, as well as retrospective and prospective studies. The parameters studied included the nature of the biguanide eye drops used, the duration of treatment, the wearing of contact lenses, the presence of bilateral keratitis, the need for keratoplasty and the measurement of visual acuity before and after treatment. Our results showed no significant difference of cure rate between CLX and PHMB administered as monotherapy. Furthermore, treatment duration was lower with CLX as monotherapy. Our meta-analysis did not show a significant difference between treatment with CLX (as monotherapy or in combination with a diamidine) and treatment with PHMB (as monotherapy or in combination with a diamidine). Finally, our meta-analysis showed a significant difference of treatment duration between chlorhexidine alone and combined with a diamidine. Our meta-analysis did not investigate the toxicity of the molecules on the patients. This work has highlighted the importance of CLX which can be considered as an alternative to PHMB with similar efficacy, provided that a formulation is developed and a physico-chemical stability study is performed.

Keywords: *Acanthamoeba* keratitis; biguanides; therapeutics

1. Introduction

Acanthamoeba is a free-living ubiquitous amoeba that can cause *Acanthamoeba* keratitis (AK) [1]. The genus *Acanthamoeba* belongs to the class *Discosea* of the phylum *Amoebozoa*. First described in 1974 [2], AK is a rare but serious disease that can lead, if left untreated, to severe pain, permanent vision loss [3] and the need for enucleation [4,5]. AK is an infection that affects mostly contact lens (CL) wearers in developed countries [6]. In the Netherlands, the number of cases increased from 16 in 2009 to 49 in 2015 for the whole population, resulting in an average annual increase of 20.5 % [7]. Similarly, the mean number of cases increased in New Zealand, from 3.6 cases per year between 2001 and 2009 to 8.6 cases per year between 2009 and 2016 for the whole population [8]. This increase in incidence can be explained by improved diagnosis and increasing proportion of CL wearers. Indeed, the proportion of contact lens wearers is increasing worldwide each year, due to myopia, which is even more prevalent in Asia [9]. In developing countries, AK mostly affects patients after corneal trauma, soil exposure or exposure to contaminated water [10,11]. This protozoan presents two distinct forms: trophozoite or cystic. The trophozoite form is the active form that allows it to feed, reproduce and move. The cystic form is the resistance form that allows it to withstand unfavorable environmental conditions (pH, temperature, dehydration) [1,3]. These cysts, which are resistant to many molecules, are one of the main reasons why it is difficult to treat AK. . Following trauma to the cornea or failure to care for contact lenses which get contaminated, *Acanthamoeba* adheres to the corneal epithelium with proteinase mannose induced protein (MIP) 133 before

destroying it and entering the corneal stroma. As the stroma is dissolved by collagenases, the trophozoites progress to the endothelium and can wrap around the nerves, causing very painful keratoneuritis [12–14]. Among the molecules that have been tested on amoebae are antifungals. Triazole antifungals such as voriconazole have shown clinical efficacy [15,16], but an *in vitro* study showed insufficient cysticidal activity [17]. Itraconazole has also been studied, but one study showed that it is less effective than voriconazole [18]. Concerning imidazole antifungals, no evidence of cysticidal efficacy was found during *in vitro* studies [19], and they are therefore not recommended in monotherapy. Caspofungin, a member of the echinocandin class of antifungals, showed interesting cysticidal activity in an *in vitro* study [20]. Neomycin, an aminoglycoside antibiotic, was formerly used. However, it was abandoned due to a lack of efficacy and high toxicity [21–23]. Miltefosine, an antineoplastic used to treat certain breast cancers or to treat leishmaniasis, has been used *per os* or as an eye drop. It is less used today because of significant toxicity and a teratogenic effect [24–26]. Povidone-iodine has been shown to be effective on trophozoites and cystic forms *in vitro*, but its clinical efficacy has not been demonstrated [27]. *In vitro* studies have shown the efficacy of diamidines such as propamidine or hexamidine against trophozoites. However, studies are contradictory regarding their efficacy on cysts [28,29]. Therefore, they are not recommended in monotherapy. Belonging to the biguanides class, two molecules are described in the scientific data as being effective on both forms whilst at the same time inducing minimum side effects: chlorhexidine (CLX) and polyhexanide, also known as polyhexamethylene biguanide (PHMB) [3,4,27,30]. However, to the best of our knowledge, there is no licensed anti-amoebic ophthalmic formulation available anywhere in the world. Biguanide eye drops must therefore be prepared in hospital pharmacies from pharmaceutical raw materials, when available [31]. They are usually administered at a concentration of 0.02 % (200 µg/mL) in combination with diamidines at 0.1 % (1 mg/mL) [32]. Unfortunately, due to a lack of structured, comparable and good quality data in the literature, it is difficult to define which treatment is the most efficient to treat AK. The aim of our study was therefore to conduct an extensive review of the literature and perform a meta-analysis of the data available to investigate which one (PHMB or CLX) is the most effective for treating AK.

2. Materials and Methods

Using the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement [33], the words “Acanthamoeba keratitis treatment polyhexanide”, “Acanthamoeba keratitis treatment chlorhexidine”, “Acanthamoeba keratitis treatment biguanides” were used to search the Pubmed database. The words “Acanthamoeba keratitis treatment polyhexanide chlorhexidine” were used to search on the Google scholar database. These searches were conducted between 14th April 2022 and 25th May 2022. For this meta-analysis, the following criteria were investigated: published in English or French language, clinical study on humans and case reports [34], treatment of AK with biguanide eye drops. The following criteria were used to exclude articles: published in a language other than English or French, *in vitro* or animal studies, reviews, not concerning the treatment of AK with biguanides, retracted from the database. Each article was included in an excel spreadsheet with the following details: title, author, year of publication, study type, digital object identifier (DOI) or Pubmed identifier (PMID). 2 reviewers participated in the inclusion of the articles. For each included study, the main criteria were: number of patients, molecule administered, duration of treatment and number of cured patients. The following criteria were also

studied: concentration of the ophthalmic solution, age of the patients, sex ratio, number of contact lens wearers, number of patients who underwent keratoplasty, number of bilateral keratitis, visual acuity (VA) before and after treatment (decimal notation) and the time between the two visual acuity measurements. For visual acuity, we assigned a value of 0 when the visual acuity value was “hand movement close to the face” (HMCF), “counting fingers” (CF), or “light perception” (LP). For a patient, in case of treatment failure and switch by another molecule or combination, this patient was considered as being a “new” patient from a statistical point of view.

Statistical analysis was performed using Stata software (version 15; StataCorp, College Station, Texas, USA). All tests were two-sided, with an alpha level set at 5 %. Categorical variables were expressed as frequencies and associated percentages, and continuous variables as mean \pm standard deviation or median [25th; 75th percentiles], according to statistical distribution. For individualized data, comparisons between groups were performed using linear mixed models for the VA difference and the duration of treatment, and with generalized linear mixed models with logit link function for the healing of patients. In these models, the group “PHMB total vs CLX total vs PHMB + CLX” was a fixed effect and the studies were considered as random effects. If necessary, a logarithmic transformation of the dependent variable was made to achieve normality. Censored data “time to recovery” were estimated using the Kaplan-Meier method, and comparisons between groups were made with the log-rank test.

3. Results and discussion

3.1 Studies inclusion

Based on our keywords, a total of 396 articles were screened after the duplicates were removed. Of these 396 articles, 222 were excluded following scanning of the abstract. Of the remaining 174, 5 were not available in full. 169 articles were therefore read and 99 were selected for the meta-analysis. Figure 11 describes the article search and screening process in the flow chart. 76.8 % of the articles were case reports (n = 76), 9.1 % were non-randomized prospective studies (n = 9) and 12.1 % were retrospective studies (n = 12). From our research, we found 2 randomized prospective studies. The summary of the 99 studies is shown in **Table 1**.

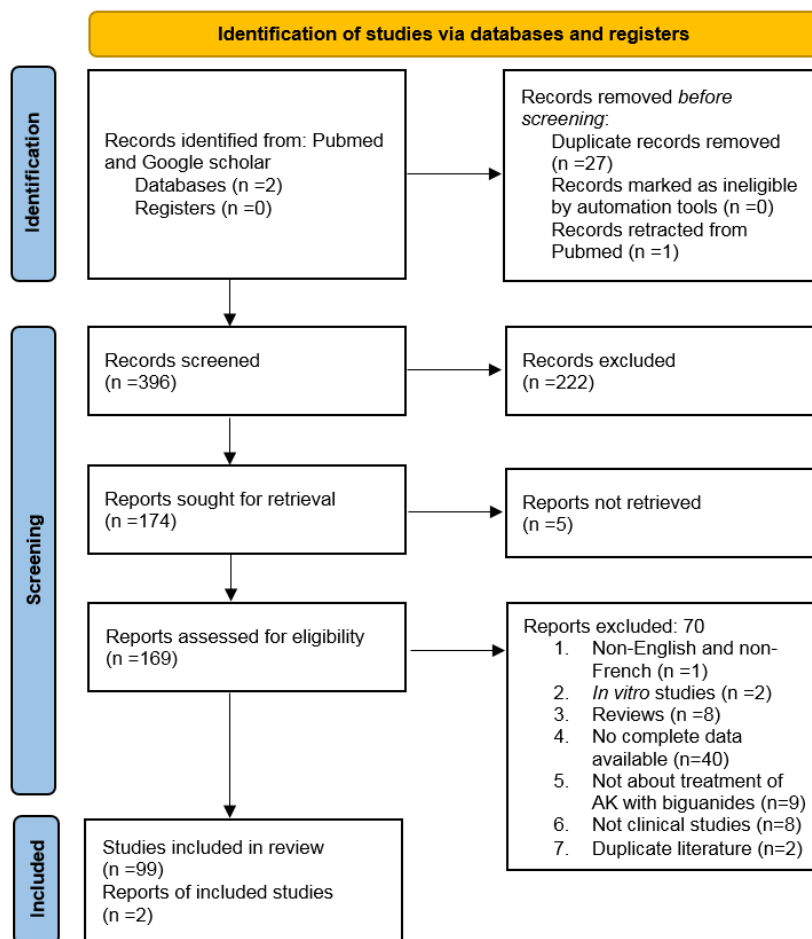


Figure 11. PRISMA flowchart data

Table 1. Synthesis of the 99 articles included in our meta-analysis, classified by type of article then by year of publication.

Author [reference]	Year	Type of article	Type of treatment	Number of patients
Illingworth et al. [35]	1995	Retrospective study	PHMB + propamidine	16
Duguid et al. [36]	1997	Retrospective study	PHMB + propamidine	105
Pérez-Santonja et al. [37]	2003	Retrospective study	PHMB / PHMB + hexamidine / CLX + hexamidine / PHMB + propamidine	8
Sun et al. [38]	2006	Retrospective study	CLX	20
Lin et al. [39]	2009	Retrospective study	PHMB + propamidine	11
Kaiserman et al. [40]	2012	Retrospective study	PHMB / CLX	50
Yamazoe et al. [41]	2012	Retrospective study	CLX	35
Taneja et al. [42]	2013	Retrospective study	PHMB + CLX	2

Pinna et al. [43]	2017	Retrospective study	PHMB	4
Hassan et al. [44]	2019	Retrospective study	PHMB + CLX / PHMB + propamide	8
Jo et al. [45]	2020	Retrospective study	PHMB / CLX / PHMB+CLX	19
Musayeva et al. [46]	2020	Retrospective study	PHMB + propamide	28
Bonini et al. [47]	2021	Retrospective study	PHMB + propamide	19
Lim et al. [30]	2008	Randomized prospective study	PHMB / CLX	51
Rahimi et al. [48]	2015	Randomized prospective study	CLX	31
Bagga et al. [49]	2021	Randomized prospective study	PHMB + CLX	10
Varga et al. [50]	1993	Prospective study	PHMB + propamide	5
Seal et al. [51]	1996	Prospective study	CLX + propamide	11
Azuara-Blanco et al. [52]	1997	Prospective study	PHMB + propamide	10
Kosrirukvongs et al. [53]	1999	Prospective study	CLX	5
Matsumoto et al. [54]	2007	Prospective study	CLX	4
Shiraishi et al. [55]	2010	Prospective study	CLX	1
Megha et al. [56]	2020	Prospective study	PHMB	10
Larkin et al. [22]	1992	Case Report	PHMB + propamide	6
Gray et al [57]	1994	Case Report	PHMB	1
Rivasi et al. [58]	1995	Case Report	PHMB	1
Skarin et al. [59]	1996	Case Report	PHMB	1
Murdoch et al. [60]	1998	Case Report	PHMB / PHMB + propamide	4
Tseng et al. [61]	1998	Case Report	PHMB	1
Gajdatsy et al. [62]	2000	Case Report	PHMB + propamide	1
Lam et al. [63]	2000	Case Report	PHMB / PHMB + propamide	3
Tabin et al. [64]	2001	Case Report	PHMB / PHMB + propamide	2
Cremona et al. [65]	2002	Case Report	PHMB / PHMB + propamide	2
Murthy et al. [66]	2002	Case Report	CLX + propamide	1
Kitagawa et al. [67]	2003	Case Report	CLX	2
Rama et al. [68]	2003	Case Report	PHMB + propamide	1
Xuguang et al. [69]	2003	Case Report	CLX	3
Ehlers et al. [70]	2004	Case Report	CLX + propamide	2
Yu et al. [71]	2004	Case Report	PHMB + hexamidine / PHMB	3
Wilhelmus et al. [72]	2005	Case Report	CLX + hexamidine	1
Balasubramanya et al. [73]	2006	Case Report	PHMB + CLX	1
Demirci et al. [74]	2006	Case Report	CLX + hexamidine	1
Georgakopoulos et al. [75]	2006	Case Report	PHMB	1
Kaur et al. [76]	2007	Case Report	PHMB	1
Lee et al. [77]	2007	Case Report	PHMB + CLX	4

Lee et al. [78]	2007	Case Report	PHMB + CLX	1
Lindsay et al. [79]	2007	Case Report	PHMB + propamidine / CLX + propamidine	4
Voyatzis et al. [80]	2007	Case Report	PHMB + propamidine	1
Wong et al. [81]	2007	Case Report	PHMB + propamidine	1
Gooi et al. [82]	2008	Case Report	CLX	1
Sahu et al. [83]	2008	Case Report	PHMB	1
Xuan et al. [84]	2008	Case Report	PHMB	3
Elabjer et al. [85]	2009	Case Report	CLX + hexamidine	1
Guerriero et al. [86]	2009	Case Report	PHMB + propamidine	1
McKelvie et al. [87]	2009	Case Report	PHMB + propamidine	1
Stapleton et al. [88]	2009	Case Report	PHMB + CLX	1
Bang et al. [15]	2010	Case Report	CLX + hexamidine / PHMB + propamidine	2
Kandori et al. [89]	2010	Case Report	CLX	4
Kim et al. [90]	2010	Case Report	PHMB	1
Lee et al. [91]	2010	Case Report	CLX + propamidine	1
Lee et al. [91]	2010	Case Report	CLX + propamidine	3
Alfawaz et al. [92]	2011	Case Report	PHMB + CLX	2
Ferrari et al. [93]	2011	Case Report	PHMB + hexamidine / CLX / PHMB + CLX	1
Itahashi et al. [94]	2011	Case Report	CLX	2
Moreno-Montañés et al. [95]	2011	Case Report	CLX + propamidine	1
Arnalich-Montiel et al. [96]	2012	Case Report	CLX	1
Li et al. [97]	2012	Case Report	PHMB + propamidine	4
Greenwell et al. [98]	2013	Case Report	PHMB / PHMB + propamidine	2
Patel et al. [99]	2013	Case Report	CLX + propamidine / PHMB + propamidine	1
Van Zyl et al. [100]	2013	Case Report	PHMB + propamidine	1
Arance-Gil et al. [101]	2014	Case Report	CLX + propamidine / PHMB + hexamidine	1
Tran et al. [102]	2014	Case Report	PHMB + CLX	1
Igras et al. [103]	2015	Case Report	PHMB + propamidine	1
Mateo et al. [104]	2015	Case Report	CLX + propamidine	1
Sengor et al. [105]	2015	Case Report	CLX + propamidine	1
Ferreira Mendes et al. [106]	2017	Case Report	CLX + propamidine	1
Hou et al. [107]	2017	Case Report	CLX	1
Kwok et al. [108]	2017	Case Report	PHMB + propamidine	1
Sengor et al. [109]	2017	Case Report	PHMB + propamidine	1
Buchele et al. [110]	2018	Case Report	PHMB + CLX	1
De Borja Domínguez- Serrano et al. [111]	2018	Case Report	CLX + propamidine	1
Mohammadpour et al. [112]	2018	Case Report	PHMB + CLX	1
Tan et al. [113]	2018	Case Report	CLX	1
Tavassoli et al. [26]	2018	Case Report	PHMB / PHMB +	1

			hexamidine / CLX + hexamidine	
Dewan et al. [114]	2019	Case Report	PHMB + CLX	1
Hirabayashi et al. [24]	2019	Case Report	CLX + PHMB / CLX + propamidine	1
Hsu [115]	2019	Case Report	CLX	1
Singh et al. [116]	2019	Case Report	PHMB / PHMB + CLX	1
Al-Yousuf et al. [117]	2020	Case Report	CLX + propamidine	1
Cubuk et al. [118]	2020	Case Report	CLX + propamidine	1
Hsu et al. [119]	2020	Case Report	PHMB	1
Lee et al. [120]	2020	Case Report	PHMB + CLX	1
Al-Motowa et al. [121]	2021	Case Report	CLX + propamidine	1
Korkmaz et al. [122]	2021	Case Report	CLX + propamidine	1
Naranjo et al. [25]	2021	Case Report	PHMB + CLX	1
Raghavan et al. [123]	2021	Case Report	PHMB + CLX	1
Roszkowska et al. [124]	2021	Case Report	PHMB	1
Wu et al. [125]	2021	Case Report	CLX	2
Lee et al. [126]	2022	Case Report	PHMB + CLX	1

3.2 Individualised data

3.2.1 Cure rate

Based on the studies where individualized data was available, the overall cure rate was of 81.04 % (n = 171 patients). PHMB as monotherapy had a cure rate of 77.42 % (n = 24) while CLX alone had a cure rate of 81.08 % (n = 30) with no significant difference between the two. As too few patients were treated with hexamidine in our study (n = 9), we pooled the groups of patients treated with diamidines (biguanide + propamidine or hexamidine) see **Table 2**. PHMB combined with diamidines had the best cure rate with 88.46 % (n = 69) without significant difference with CLX combined with diamidines (p = 0.17) which had a cure rate of 72.09 % (n = 31).

Table 2. Cure rate, treatment duration and visual acuity (VA) difference before and after treatment with individualized data for PHMB (polyhexanide) and CLX (chlorhexidine) as monotherapy or in combination with a diamidine (propamidine or hexamidine). n: number of patients.

	PHMB	CLX	PHMB + diamidine	CLX + diamidine
Cure rate, % (n)	77.4 (24)	81.1 (30)	88.5 (69)	72.1 (31)
Among cured patients: Months of treatment [IQR]	6.0 [3.0-7.5]	3.0 [1.4-8.0]	4.0 [3.0-7.0]	3.2 [1.8-6.4]
Median VA difference [IQR]	0.391 [0.000-0.750]	0.475 [0.259-0.810]	0.333 [0.010-0.500]	0.229 [0.000-0.330]

To further investigate the impact of PHMB versus CLX, all patients treated with either PHMB or CLX (as a monotherapy or combined with a diamidine) were pooled, see data presented in **Table 3**. The cure rate was of 76.25 % (n = 61) when the treatment was based on CLX and 85.32 % (n = 93) when the treatment was based on PHMB. The cure rate of the PHMB + CLX group was of 77.27 % (n = 17). There was no statistical cure rate difference among the studied treatments (p > 0.05).

Table 3. Cure rate, treatment duration and visual acuity difference before and after treatment with individualized data. PHMB total = polyhexanide as monotherapy + polyhexanide combined with a diamidine (propamidine and hexamidine). CLX total = chlorhexidine as monotherapy + chlorhexidine combined with a diamidine. n: number of patients.

	PHMB total	CLX total	PHMB + CLX	Sum of individualised data (n)
Cure rate, % (n)	85.32 (93)	76.25 (61)	77.27 (17)	81.04 (171)
Among cured patients : Months of treatment [IQR]	4.0 [3.0-7.0]	3.0 [1.8-7.0]	5.01 [3.0-6.0]	4.0 [2.3-7.0] (171)
Median VA difference [IQR]	0.333 [0.000-0.536]	0.354 [0.000-0.767]	0.484 [0.000-0.800]	0.333 [0.000-0.714] (143)

These results showed similar cure rates to those found in the literature [30,36,38,56]. Nevertheless, the cure rate of PHMB + CLX treatment is lower than expected. Indeed, a synergistic effect between these two potent molecules could have been expected, for example with a shorter treatment duration, as shown in a recent randomized study where the median duration of treatment was 1.11 months (IQR, 0.64-2.87 months) with this association [38]. This could be explained by the use of this combination in the case reports studied here for more complicated and severe cases [93,126]. According to our metanalysis, the combination of a biguanide with a diamidine does not improve the efficacy of the treatment. This has already been described in a retrospective study in 2019 with 50 patients treated with PHMB monotherapy and 114 treated with PHMB + diamidine. The failure rates at 12 months were 26.0% and 27.2% respectively [4]. Furthermore, it seems that the efficacy of CLX is similar to that of PHMB, when based on this main criteria.

3.2.2 Treatment duration

There was a significant difference between CLX monotherapy compared to PHMB monotherapy ($p = 0.017$) and compared to CLX combined with diamidine ($p = 0.044$) with values of 3.0 months (IQR, 1.4-8.0 months), 6.0 months (IQR, 3.0-7.5 months) and 3.22 months (IQR, 1.8-6.4 months) respectively as shown in **Table 2**. However, the results between PHMB total and CLX total were comparable in **Table 3** with 4.0 months (IQR, 3.0-7.0 months) and 3.0 months (IQR, 1.8-7.0 months). Treatment duration with PHMB + CLX was 5.0 months (IQR, 3.0-6.0 months) without significant difference with other treatments. From **Figure 12** it can be seen that the PHMB + CLX association showed a better cure rate at 6 months and 9 months compared to all the other treatments, but there was no significant difference between the studied treatments ($p = 0.86$).

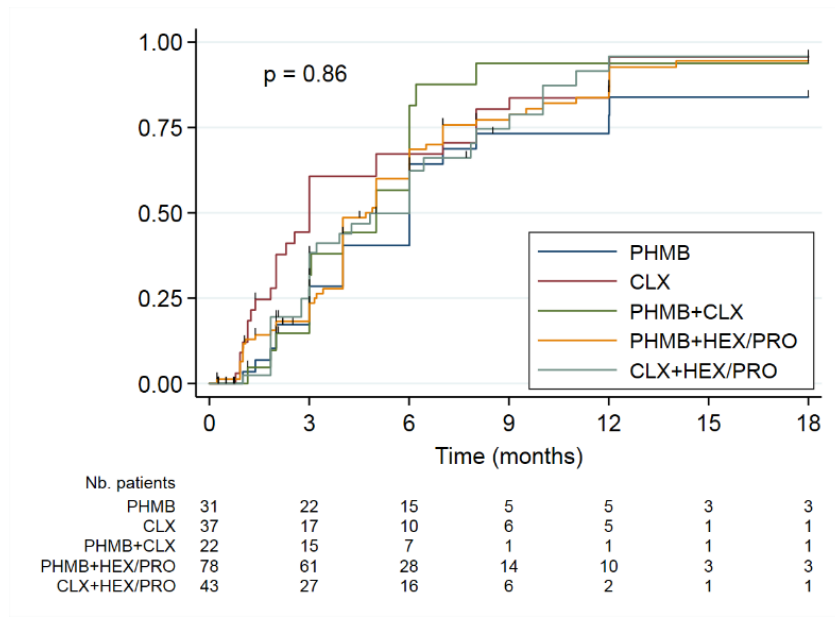


Figure 12. Cure rate evolution in time with individualized data for all treatments. PHMB = polyhexanide as monotherapy. CLX = chlorhexidine as monotherapy. PHMB + CLX = polyhexanide + chlorhexidine as bitherapy. PHMB + HEX/PRO = polyhexanide + diamidine (propamidine + hexamidine). CLX + HEX/PRO = chlorhexidine + diamidine.

Our results are in agreement with the case reports and retrospective studies regarding the median duration of treatment [36,69]. However, the addition of a diamidine does not reduce the duration of treatment for cured patients. This may be due to an incompatibility between the cation chlorhexidine and the anions present in the excipients of Brolene® and Desomedine® eye drops, especially the chloride ions. This was described in a retrospective study in 2021: Three patients were treated with biguanide monotherapy and 32 with biguanide combined with diamidine with follow-up times of 20.2 ± 28.7 months and 20.4 ± 30.3 months respectively [127]. This article was not included in our meta-analysis because there were no details of the nature of the treatments in each patient group. In our metanalysis, the treatment time is longer than in the randomized studies [30,49] without significant treatment duration in the randomized study between CLX and PHMB monotherapy [30]. This could be due to the more elaborate diagnostic method and the more rigorous follow-up of patients in this type of study. In addition, a short treatment could lead to an increased risk of recurrence.

3.2.3 Visual acuity recovery

From 143 patients for whom the individualized data were available, the median VA difference before and after treatment was 0.333 (IQR, 0.000-0.714). VA difference was 0.475 (IQR, 0.259-0.810) with CLX as monotherapy and was comparable to 0.391 (IQR, 0.000-0.750) with PHMB alone ($p = 0.076$). Best VA difference was 0.484 (IQR, 0.000-0.800) for PHMB + CLX but there was no significant difference with CLX combined with diamidine which was 0.229 (IQR, 0.000-0.330) ($p = 0.11$).

These results are in line with those expected. CLX and PHMB appear to be effective in the literature. It is therefore logical that VA is improved after the cure. However, it is known that for a number of healed patients, the VA recovery is insufficient due to corneal scarring caused by the infection, and that keratoplasty is usually required [41,128]. Consequently, it is difficult to

consider the recovery of visual acuity as a measure of the effectiveness of the therapy.

3.3 Total data

Based on our results showed **Table 4**, a total of 608 patients were treated. The average age was 30.3 ± 10.9 years, the sex ratio male/female was 0.909. Most of the patients were contact lens wearers (75.12 %), 14.33 % underwent keratoplasty (n = 87) and 4.12 % (n = 25) had bilateral keratitis. The rate of bilateral keratitis is in line with the literature (about 4 % in our meta-analysis versus 5 %). The rate of contact lens wearers is lower than in the literature (70 % versus 90 %). This may be due to the lack of data in some studies that do not specify the number of patients wearing lenses. However, this confirms that amoebic keratitis mainly affects contact lens wearers. The cure rate was 90.12 % and the mean duration of treatment was 5.2 ± 2.3 months. The mean difference in visual acuity before and after treatment was 0.379 ± 0.498 with a mean VA before treatment of 0.226 ± 0.200 and a mean VA after treatment of 0.604 ± 0.223 . The average follow-up time between both VA measurements was 6.5 ± 2.9 months. Based on average age and sex ratio, it is also a condition that principally affects young adults and slightly more women. Lens wearers are more common in younger populations, including women, which may explain this difference [46].

The clinical results of our meta-analysis confirm the *in vitro* studies showing the efficacy of these molecules without significant difference between medications. A 1994 *in vitro* study showed that after 48 h of incubation, PHMB and CLX had minimum cysticidal concentrations (MCC) well below 20 $\mu\text{g/mL}$, with eye drops generally concentrated at 200 $\mu\text{g/mL}$ [21]. Another *in vitro* study from 2002 showed that after 24 h of incubation, PHMB and CLX had MCCs of 3.2 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and 26.7 ± 17.4 $\mu\text{g/mL}$ respectively [29]. When researching and reading the articles, we found differences in the quality of the data. Prospective randomized studies and retrospective studies define the study criteria, but individual data is too often missing so it is impossible to obtain standard deviations. The case reports generally provided very detailed individual data. According to our results, treatment with chlorhexidine 0.02 % or polyhexanide 0.02 % eye drops are also effective (cure rates and mean durations not significantly different). Our study did not consider the frequency of administration or the improvement in prognosis with early management. These parameters could have an influence on the patient's recovery.

Table 4. Number of patients in each type of study (individualized or grouped data). SD = Standard deviation.

	number of patients	mean age \pm SD, years	sex ratio (male/female)	Contact lens wearers (%)	number of bilateral keratitis (%)
Individualized data	211	30.2 ± 13.9	0.69 (75/109)	165 (78.2 %)	18 (8.5 %)
Grouped data	397	29.2 ± 7.3	1.08 (156/144)	291 (73.3 %)	7 (1.8 %)

5. Conclusion

With the results of our meta-analysis, CLX can be considered as an alternative to PHMB with similar efficacy according to the parameters studied (cure rate, treatment time and VA recovery). However, toxicity was not investigated in this study. These results support the preparation and the study of the physicochemical stability of a CLX digluconate ophthalmic formulation.

6. Patents

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Illingworth, C.D.; Cook, S.D. Acanthamoeba Keratitis. *Surv Ophthalmol* **1998**, *42*, 493–508, doi:10.1016/s0039-6257(98)00004-6.
2. Naginton, J.; Watson, P.G.; Playfair, T.J.; McGill, J.; Jones, B.R.; Steele, A.D. Amoebic Infection of the Eye. *Lancet* **1974**, *2*, 1537–1540, doi:10.1016/s0140-6736(74)90285-2.
3. Dart, J.K.G.; Saw, V.P.J.; Kilvington, S. Acanthamoeba Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. *Am J Ophthalmol* **2009**, *148*, 487–499.e2, doi:10.1016/j.ajo.2009.06.009.
4. Papa, V.; Rama, P.; Radford, C. Acanthamoeba Keratitis Therapy: Time to Cure and Visual Outcome Analysis for Different Antiamoebic Therapies in 227 Cases. *Bj ophtalmol* **2019**, *104*, 575–581, doi:10.1136/bjophthalmol-2019-314485.
5. Parmar, D.N.; Awwad, S.T.; Petroll, W.M.; Bowman, R.W.; McCulley, J.P.; Cavanagh, H.D. Tandem Scanning Confocal Corneal Microscopy in the Diagnosis of Suspected Acanthamoeba Keratitis. *Ophthalmology* **2006**, *113*, 538–547, doi:10.1016/j.ophtha.2005.12.022.
6. Stehr-Green, J.K.; Bailey, T.M.; Visvesvara, G.S. The Epidemiology of Acanthamoeba Keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol* **1989**, *107*, 331–336, doi:10.1016/0002-9394(89)90654-5.
7. Randag, A.C.; van Rooij, J.; van Goor, A.T.; Verkerk, S.; Wisse, R.P.L.; Saelens, I.E.Y.; Stoutenbeek, R.; van Dooren, B.T.H.; Cheng, Y.Y.Y.; Eggink, C.A. The Rising Incidence of Acanthamoeba Keratitis: A 7-Year Nationwide Survey and Clinical Assessment of Risk Factors and Functional Outcomes. *PLoS One* **2019**, *14*, e0222092, doi:10.1371/journal.pone.0222092.
8. McKelvie, J.; Alshiakhi, M.; Ziaei, M.; Patel, D.V.; McGhee, C.N. The Rising Tide of Acanthamoeba Keratitis in Auckland, New Zealand: A 7-Year Review of Presentation, Diagnosis and Outcomes (2009–2016). *Clin Exp Ophthalmol* **2018**, *46*, 600–607, doi:10.1111/ceo.13166.
9. Ting, D.S.J.; Ho, C.S.; Deshmukh, R.; Said, D.G.; Dua, H.S. Infectious Keratitis: An Update on Epidemiology, Causative Microorganisms, Risk Factors, and Antimicrobial Resistance. *Eye (Lond)* **2021**, *35*, 1084–1101, doi:10.1038/s41433-020-01339-3.
10. Sharma, S.; Garg, P.; Rao, G.N. Patient Characteristics, Diagnosis, and Treatment of Non-Contact Lens Related Acanthamoeba Keratitis. *Br J Ophthalmol* **2000**, *84*, 1103–1108, doi:10.1136/bjo.84.10.1103.
11. Bharathi, J.M.; Srinivasan, M.; Ramakrishnan, R.; Meenakshi, R.; Padmavathy, S.; Lalitha, P.N. A Study of the Spectrum of Acanthamoeba Keratitis: A Three-Year Study at a Tertiary Eye Care Referral Center in South India. *Indian J Ophthalmol* **2007**, *55*, 37–42, doi:10.4103/0301-4738.29493.
12. Fanselow, N.; Sirajuddin, N.; Yin, X.-T.; Huang, A.J.W.; Stuart, P.M. Acanthamoeba Keratitis, Pathology, Diagnosis and Treatment. *Pathogens* **2021**, *10*, 323, doi:10.3390/pathogens10030323.
13. Panjwani, N. Pathogenesis of Acanthamoeba Keratitis. *Ocul Surf* **2010**, *8*, 70–79, doi:10.1016/s1542-0124(12)70071-x.
14. Khan, N.A. Pathogenesis of Acanthamoeba Infections. *Microb Pathog* **2003**, doi:DOI: 10.1016/S0882-4010(03)00061-5.
15. Bang, S.; Edell, E.; Eghrari, A.O.; Gottsch, J.D. Treatment with Voriconazole in 3 Eyes with Resistant Acanthamoeba Keratitis. *Am J Ophthalmol* **2010**, *149*, 66–69, doi:10.1016/j.ajo.2009.08.004.
16. Tu, E.Y.; Joslin, C.E.; Shoff, M.E. Successful Treatment of Chronic Stromal Acanthamoeba Keratitis with Oral Voriconazole Monotherapy. *Cornea* **2010**, *29*, 1066–1068, doi:10.1097/ICO.0b013e3181cbfa2c.
17. Gueudry, J.; Le Goff, L.; Compagnon, P.; Lefevre, S.; Colasse, E.; Aknine, C.; Duval, F.; François, A.; Razakandrainibe, R.; Ballet, J.J.; et al. Evaluation of Voriconazole Anti-Acanthamoeba Polyphaga in Vitro Activity, Rat Cornea Penetration and Efficacy against Experimental Rat Acanthamoeba Keratitis. *J Antimicrob Chemother* **2018**, *73*, 1895–1898, doi:10.1093/jac/dky094.
18. Hernández-Martínez, D.; Reyes-Batlle, M.; Castelan-Ramírez, I. Evaluation of the Sensitivity to Chlorhexidine, Voriconazole and Itraconazole of T4 Genotype Acanthamoeba Isolated from Mexico. *Exp Parasitol* **2019**, *197*, 29–35, doi:10.1016/j.exppara.2019.01.006.
19. Elder, M.J.; Kilvington, S.; Dart, J.K. A Clinicopathologic Study of in Vitro Sensitivity Testing and Acanthamoeba Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **1994**, *35*, 1059–1064.

20. Bouyer, S.; Imbert, C.; Daniault, G.; Cateau, E.; Rodier, M.-H. Effect of Caspofungin on Trophozoites and Cysts of Three Species of Acanthamoeba. *J Antimicrob Chemother* **2007**, *59*, 122–124, doi:10.1093/jac/dkl451.
21. Hay, J.; Kirkness, C.M.; Seal, D.V. Drug Resistance and Acanthamoeba Keratitis: The Quest for Alternative Antiprotozoal Chemotherapy. *Eye (Lond)* **1994**, *8*, 555–563, doi:10.1038/eye.1994.137.
22. Larkin, D.F.; Kilvington, S.; Dart, J.K. Treatment of Acanthamoeba Keratitis with Polyhexamethylene Biguanide. *Ophthalmology* **1992**, *99*, 185–191, doi:10.1016/s0161-6420(92)31994-3.
23. Acanthamoeba Keratitis Fact Sheet for Healthcare Professionals Available online: https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/health_professionals/acanthamoeba_keratitis_hcp.html.
24. Hirabayashi, K.E.; Lin, C.C.; Ta, C.N. Oral Miltefosine for Refractory Acanthamoeba Keratitis. *Am J Ophthalmol Case Rep* **2019**, *16*, 100555, doi:10.1016/j.ajoc.2019.100555.
25. Naranjo, A.; Martinez, D.M. Systemic Miltefosine as an Adjunct Treatment of Progressive Acanthamoeba Keratitis. *Ocul Immunol Inflamm* **2021**, *29*, 1576–1584, doi:10.1080/09273948.2020.1758156.
26. Tavassoli, S.; Buckle, M.; Tole, D.; Chiodini, P.; Darcy, K. The Use of Miltefosine in the Management of Refractory Acanthamoeba Keratitis. *Cont Lens Anterior Eye* **2018**, *41*, 400–402, doi:10.1016/j.clae.2018.03.007.
27. Sunada, A.; Kimura, K.; Nishi, I. In Vitro Evaluations of Topical Agents to Treat Acanthamoeba Keratitis. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 2059–2065, doi:10.1016/j.ophtha.2014.04.013.
28. Perrine, D.; Chenu, J.P.; Georges, P.; Lancelot, J.C.; Saturnino, C.; Robba, M. Amoebicidal Efficiencies of Various Diamidines against Two Strains of Acanthamoeba Polyphaga. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**, *39*, 339–342, doi:10.1128/AAC.39.2.339.
29. Kilvington, S.; Hughes, R.; Byas, J.; Dart, J. Activities of Therapeutic Agents and Myristamidopropyl Dimethylamine against Acanthamoeba Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46*, 2007–2009, doi:10.1128/AAC.46.6.2007-2009.2002.
30. Lim, N.; Goh, D.; Bunce, C.; Xing, W.; Fraenkel, G.; Poole, T.R.G.; Ficker, L. Comparison of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine as Monotherapy Agents in the Treatment of Acanthamoeba Keratitis. *Am J Ophthalmol* **2008**, *145*, 130–135, doi:10.1016/j.ajo.2007.08.040.
31. Rayamajhee, B.; Willcox, M.D.; Henriquez, F.L.; Petsoglou, C.; Carnt, N. Acanthamoeba Keratitis: An Increasingly Common Infectious Disease of the Cornea. *Lancet Microbe* **2021**, *2*, e345–e346, doi:10.1016/S2666-5247(21)00093-8.
32. Szczotka-Flynn, L.B.; Shovlin, J.P.; Schnider, C.M.; Caffery, B.E.; Alfonso, E.C.; Carnt, N.A.; Chalmers, R.L.; Collier, S.; Jacobs, D.S.; Joslin, C.E.; et al. American Academy of Optometry Microbial Keratitis Think Tank. *Optom Vis Sci* **2021**, *98*, 182–198, doi:10.1097/OPX.0000000000001664.
33. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *BMJ* **2021**, *372*, n71, doi:10.1136/bmj.n71.
34. Jackson, D.; Daly, J.; Saltman, D.C. Aggregating Case Reports: A Way for the Future of Evidence-Based Health Care? *Clin Case Rep* **2014**, *2*, 23–24, doi:10.1002/ccr3.58.
35. Illingworth, C.D.; Cook, S.D.; Karabatsas, C.H.; Easty, D.L. Acanthamoeba Keratitis: Risk Factors and Outcome. *Br J Ophthalmol* **1995**, *79*, 1078–1082, doi:10.1136/bjo.79.12.1078.
36. Duguid, I.G.; Dart, J.K.; Morlet, N.; Allan, B.D.; Matheson, M.; Ficker, L.; Tuft, S. Outcome of Acanthamoeba Keratitis Treated with Polyhexamethyl Biguanide and Propamidine. *Ophthalmology* **1997**, *104*, 1587–1592, doi:10.1016/s0161-6420(97)30092-x.
37. Pérez-Santonja, J.J.; Kilvington, S.; Hughes, R.; Tufail, A.; Matheson, M.; Dart, J.K.G. Persistently Culture Positive Acanthamoeba Keratitis: In Vivo Resistance and in Vitro Sensitivity. *Ophthalmology* **2003**, *110*, 1593–1600, doi:10.1016/S0161-6420(03)00481-0.
38. Sun, X.; Zhang, Y.; Li, R.; Wang, Z.; Luo, S.; Gao, M.; Deng, S.; Chen, W.; Jin, X. Acanthamoeba Keratitis: Clinical Characteristics and Management. *Ophthalmology* **2006**, *113*, 412–416, doi:10.1016/j.ophtha.2005.10.041.
39. Lin, H.-C.; Hsiao, C.-H.; Ma, D.H.-K.; Yeh, L.-K.; Tan, H.-Y.; Lin, M.-Y.; Huang, S.C.-M. Medical Treatment for Combined Fusarium and Acanthamoeba Keratitis. *Acta Ophthalmol* **2009**, *87*, 199–203, doi:10.1111/j.1755-3768.2008.01192.x.

40. Kaiserman, I.; Bahar, I.; McAllum, P.; Srinivasan, S.; Elbaz, U.; Slomovic, A.R.; Rootman, D.S. Prognostic Factors in Acanthamoeba Keratitis. *Can J Ophthalmol* **2012**, *47*, 312–317, doi:10.1016/j.jcjo.2012.03.040.
41. Yamazoe, K.; Yamamoto, Y.; Shimazaki-Den, S.; Shimazaki, J. Visual Outcome in Japanese Patients with Acanthamoeba Keratitis. *Eye (Lond)* **2012**, *26*, 517–522, doi:10.1038/eye.2011.366.
42. Taneja, M.; Ashar, J.N.; Mathur, A.; Nalamada, S.; Garg, P. Microbial Keratitis Following Vegetative Matter Injury. *Int Ophthalmol* **2013**, *33*, 117–123, doi:10.1007/s10792-012-9643-0.
43. Pinna, A.; Porcu, T.; Boscia, F.; Cano, A.; Erre, G.; Mattana, A. Free-Living Amoebae Keratitis. *Cornea* **2017**, *36*, 785–790, doi:10.1097/ICO.0000000000001226.
44. Hassan, F.; Bhatti, A.; Desai, R.; Barua, A. Analysis from a Year of Increased Cases of Acanthamoeba Keratitis in a Large Teaching Hospital in the UK. *Cont Lens Anterior Eye* **2019**, *42*, 506–511, doi:10.1016/j.clae.2019.04.009.
45. Jo, Y.J.; Jang, S.K.; Lee, J.; Lee, J.S. A 5-Year Review of Acanthamoeba Keratitis Related to Wearing Contact Lenses in Korea. *Eye Contact Lens* **2020**, *46*, 223–227, doi:10.1097/ICL.0000000000000669.
46. Musayeva, A.; Riedl, J.C.; Schuster, A.K.; Wasielica-Poslednik, J.; Pfeiffer, N.; Gericke, A. Topical Voriconazole as Supplemental Treatment for Acanthamoeba Keratitis. *Cornea* **2020**, *39*, 986–990, doi:10.1097/ICO.0000000000002315.
47. Bonini, S.; Di Zazzo, A.; Varacalli, G.; Coassin, M. Acanthamoeba Keratitis: Perspectives for Patients. *Curr Eye Res* **2021**, *46*, 771–776, doi:10.1080/02713683.2020.1846753.
48. Rahimi, F.; Hashemian, S.M.N.; Tafti, M.F.; Mehjerdi, M.Z.; Safizadeh, M.S.; Pour, E.K.; Sefidan, B.B. Chlorhexidine Monotherapy with Adjunctive Topical Corticosteroids for Acanthamoeba Keratitis. *J Ophthalmic Vis Res* **2015**, *10*, 106–111, doi:10.4103/2008-322X.163782.
49. Bagga, B.; Sharma, S.; Gour, R.P.S.; Mohamed, A.; Joseph, J.; M Rathi, V.; Garg, P. A Randomized Masked Pilot Clinical Trial to Compare the Efficacy of Topical 1% Voriconazole Ophthalmic Solution as Monotherapy with Combination Therapy of Topical 0.02% Polyhexamethylene Biguanide and 0.02% Chlorhexidine in the Treatment of Acanthamoeba Keratitis. *Eye (Lond)* **2021**, *35*, 1326–1333, doi:10.1038/s41433-020-1109-4.
50. Varga, J.H.; Wolf, T.C.; Jensen, H.G.; Parmley, V.C.; Rowsey, J.J. Combined Treatment of Acanthamoeba Keratitis with Propamidine, Neomycin, and Polyhexamethylene Biguanide. *Am J Ophthalmol* **1993**, *115*, 466–470, doi:10.1016/s0002-9394(14)74448-4.
51. Seal, D.; Hay, J.; Kirkness, C.; Morrell, A.; Booth, A.; Tullo, A.; Ridgway, A.; Armstrong, M. Successful Medical Therapy of Acanthamoeba Keratitis with Topical Chlorhexidine and Propamidine. *Eye (Lond)* **1996**, *10* (Pt 4), 413–421, doi:10.1038/eye.1996.92.
52. Azuara-Blanco, A.; Sadiq, A.S.; Hussain, M.; Lloyd, J.H.; Dua, H.S. Successful Medical Treatment of Acanthamoeba Keratitis. *Int Ophthalmol* **1997**, *21*, 223–227, doi:10.1023/a:1006055918101.
53. Kosrirukvongs, P.; Wanachiwanawin, D.; Visvesvara, G.S. Treatment of Acanthamoeba Keratitis with Chlorhexidine. *Ophthalmology* **1999**, *106*, 798–802, doi:10.1016/S0161-6420(99)90169-0.
54. Matsumoto, Y.; Dogru, M.; Sato, E.A.; Katono, Y.; Uchino, Y.; Shimmura, S.; Tsubota, K. The Application of in Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy in the Management of Acanthamoeba Keratitis. *Mol Vis* **2007**, *13*, 1319–1326.
55. Shiraishi, A.; Uno, T.; Oka, N.; Hara, Y.; Yamaguchi, M.; Ohashi, Y. In Vivo and in Vitro Laser Confocal Microscopy to Diagnose Acanthamoeba Keratitis. *Cornea* **2010**, *29*, 861–865, doi:10.1097/ICO.0b013e3181ca36b6.
56. Megha, K.; Thakur, A.; Khurana, S.; Sehgal, R.; Gupta, A. Acanthamoeba Keratitis: A 4-Year Review from a Tertiary Care Hospital in North India. *Nepal J Ophthalmol* **2020**, *12*, 83–90, doi:10.3126/nepjoph.v12i1.24769.
57. Gray, T.B.; Gross, K.A.; Cursons, R.T.; Shewan, J.F. Acanthamoeba Keratitis: A Sobering Case and a Promising New Treatment. *Aust N Z J Ophthalmol* **1994**, *22*, 73–76, doi:10.1111/j.1442-9071.1994.tb01700.x.
58. Rivasi, F.; Longanesi, L.; Casolari, C.; Croppo, G.P.; Pierini, G.; Zunarelli, E.; Visvesvara, G.S. Cytologic Diagnosis of Acanthamoeba Keratitis. Report of a Case with Correlative Study with Indirect Immunofluorescence and Scanning Electron Microscopy. *Acta Cytol* **1995**, *39*, 821–826.
59. Skarin, A.; Florén, I.; Kiss, K.; Miörner, H.; Stenevi, U. Acanthamoeba Keratitis in the South of Sweden. *Acta Ophthalmol Scand* **1996**, *74*, 593–597, doi:10.1111/j.1600-0420.1996.tb00742.x.

60. Murdoch, D.; Gray, T.B.; Cursons, R.; Parr, D. Acanthamoeba Keratitis in New Zealand, Including Two Cases with in Vivo Resistance to Polyhexamethylene Biguanide. *Aust N Z J Ophthalmol* **1998**, *26*, 231–236, doi:10.1111/j.1442-9071.1998.tb01317.x.
61. Tseng, S.H.; Lin, S.C.; Chen, F.K. Is Polyhexamethylene Biguanide Alone Effective for Acanthamoeba Keratitis? *Cornea* **1998**, *17*, 345–346, doi:10.1097/00003226-199805000-00019.
62. Gajdatsy, A.D.; Kosmin, A.; Barrett, G.D. Coexistent Adenoviral Keratoconjunctivitis and Acanthamoeba Keratitis. *Clin Exp Ophthalmol* **2000**, *28*, 434–436, doi:10.1046/j.1442-9071.2000.00352.x.
63. Lam, D.S.; Lyon, D.; Poon, A.S.; Rao, S.K.; Fan, D.S. Polyhexamethylene Biguanide (0.02%) Alone Is Not Adequate for Treating Chronic Acanthameoba Keratitis. *Eye (Lond)* **2000**, *14* (Pt 4), 678–679, doi:10.1038/eye.2000.174.
64. Tabin, G.; Taylor, H.; Snibson, G.; Murchison, A.; Gushchin, A.; Rogers, S. Atypical Presentation of Acanthamoeba Keratitis. *Cornea* **2001**, *20*, 757–759, doi:10.1097/00003226-200110000-00017.
65. Cremona, G.; Carrasco, M.A.; Tytiun, A.; Cosentino, M.J. Treatment of Advanced Acanthamoeba Keratitis with Deep Lamellar Keratectomy and Conjunctival Flap. *Cornea* **2002**, *21*, 705–708, doi:10.1097/00003226-200210000-00014.
66. Murthy, S.; Hawksworth, N.R.; Cree, I. Progressive Ulcerative Keratitis Related to the Use of Topical Chlorhexidine Gluconate (0.02%). *Cornea* **2002**, *21*, 237–239, doi:10.1097/00003226-200203000-00026.
67. Kitagawa, K. A Novel Combination Treatment of Chlorhexidine Gluconate, Natamycin (Pimaricin) and Debridement for a Acanthamoeba Keratitis. *Japanese Journal of Ophthalmology* **2003**, *47*, 616–617, doi:10.1016/j.jjo.2003.08.005.
68. Rama, P.; Matuska, S.; Viganò, M.; Spinelli, A.; Paganoni, G.; Brancato, R. Bilateral Acanthamoeba Keratitis with Late Recurrence of the Infection in a Corneal Graft: A Case Report. *Eur J Ophthalmol* **2003**, *13*, 311–314, doi:10.1177/112067210301300312.
69. Xuguang, S.; Lin, C.; Yan, Z.; Zhiqun, W.; Ran, L.; Shiyun, L.; Xiuying, J. Acanthamoeba Keratitis as a Complication of Orthokeratology. *Am J Ophthalmol* **2003**, *136*, 1159–1161, doi:10.1016/s0002-9394(03)00635-4.
70. Ehlers, N.; Hjortdal, J. Are Cataract and Iris Atrophy Toxic Complications of Medical Treatment of Acanthamoeba Keratitis? *Acta Ophthalmol Scand* **2004**, *82*, 228–231, doi:10.1111/j.1600-0420.2004.00237.x.
71. Yu, H.-S.; Kong, H.-H.; Kim, S.-Y.; Hahn, Y.-H.; Hahn, T.-W.; Chung, D.-I. Laboratory Investigation of Acanthamoeba Lugdunensis from Patients with Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2004**, *45*, 1418–1426, doi:10.1167/iovs.03-0433.
72. Wilhelmus, K.R. Acanthamoeba Keratitis During Orthokeratology. *Cornea* **2005**, *24*, 864–866, doi:10.1097/01.icc.0000175410.28859.bd.
73. Balasubramanya, R.; Garg, P.; Sharma, S.; Vemuganti, G.K. Acanthamoeba Keratitis after LASIK. *J Refract Surg* **2006**, *22*, 616–617, doi:10.3928/1081-597X-20060601-17.
74. Demirci, G.; Ay, G.M.; Karabas, L.V.; Altintas, Ö.; Tamer, G.S.; Çağlar, Y. Acanthamoeba Keratitis in a 5-Year-Old Boy Without a History of Contact Lens Usage. *Cornea* **2006**, *25*, 356–358, doi:10.1097/01.icc.0000178723.26940.74.
75. Georgakopoulos, C.D.; Exarchou, A.M.; Gartaganis, S.P. Unusual Case of Acanthamoeba Keratitis in a Contact Lens Wearer. *Eye Contact Lens* **2006**, *32*, 166–167, doi:10.1097/01.icl.0000189042.91077.a0.
76. Kaur, H.; Maguire, L.J.; Salomao, D.R.; Cameron, J.D. Rapid Progression of Amebic Keratitis 1 Week after Corneal Trauma and 1 Year after LASIK. *Cornea* **2007**, *26*, 212–214, doi:10.1097/ICO.0b013e31802eb136.
77. Lee, J.-E.; Hahn, T.W.; Oum, B.S.; Choi, H.Y.; Yu, H.S.; Lee, J.S. Acanthamoeba Keratitis Related to Orthokeratology. *Int Ophthalmol* **2007**, *27*, 45–49, doi:10.1007/s10792-007-9055-8.
78. Lee, J.S.; Hahn, T.W.; Choi, S.H.; Yu, H.S.; Lee, J.-E. Acanthamoeba Keratitis Related to Cosmetic Contact Lenses. *Clin Exp Ophthalmol* **2007**, *35*, 775–777, doi:10.1111/j.1442-9071.2007.01622.x.
79. Lindsay, R.G.; Watters, G.; Johnson, R.; Ormonde, S.E.; Snibson, G.R. Acanthamoeba Keratitis and Contact Lens Wear. *Clinical and Experimental Optometry* **2007**, *90*, 351–360, doi:10.1111/j.1444-0938.2007.00172.x.
80. Voyatzis, G.; McElvanney, A. Bilateral Acanthamoeba Keratitis in an Experienced Two-Weekly Disposable Contact Lens Wearer. *Eye Contact Lens* **2007**, *33*, 201–202, doi:10.1097/01.icl.0000252567.06446.7b.

81. Wong, V.W.Y.; Chi, S.C.C.; Lam, D.S.C. Good Visual Outcome after Prompt Treatment of Acanthamoeba Keratitis Associated with Overnight Orthokeratology Lens Wear. *Eye Contact Lens* **2007**, *33*, 329–331, doi:10.1097/ICL.0b013e318030d5cf.
82. Gooi, P.; Lee-Wing, M.; Brownstein, S.; El-Defrawy, S.; Jackson, W.B.; Mintsoulis, G. Acanthamoeba Keratitis: Persistent Organisms without Inflammation after 1 Year of Topical Chlorhexidine. *Cornea* **2008**, *27*, 246–248, doi:10.1097/ICO.0b013e31815b82a2.
83. Sahu, S.K.; Das, S.; Sharma, S.; Vemuganti, G.K. Acanthamoeba Keratitis Presenting as a Plaque. *Cornea* **2008**, *27*, 1066–1067, doi:10.1097/ICO.0b013e318174dbe6.
84. Xuan, Y.-H.; Chung, B.-S.; Hong, Y.-C.; Kong, H.-H.; Hahn, T.-W.; Chung, D.-I. Keratitis by Acanthamoeba Triangularis: Report of Cases and Characterization of Isolates. *Korean J Parasitol* **2008**, *46*, 157–164, doi:10.3347/kjp.2008.46.3.157.
85. Elabjer, B.K.; Busić, M.; Sviben, M.; Elabjer, E.; Predović, J. Painless Acanthamoeba Keratitis in a Soft Contact Lens Wearer--Case Report. *Coll Antropol* **2009**, *33*, 951–954.
86. Guerriero, S.; La Tegola, M.G.; Monno, R.; Apruzzese, M.; Cantatore, A. A Case of Descemet's Membrane Rupture in a Patient Affected by Acanthamoeba Keratitis. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice* **2009**, *35*, 338–340, doi:10.1097/ICL.0b013e3181b912d6.
87. McKelvie, J.; Patel, D.; McGhee, C. Cosmetic Contact Lens-Related Acanthamoeba Keratitis. *Clin Exp Ophthalmol* **2009**, *37*, 419–420, doi:10.1111/j.1442-9071.2009.02052.x.
88. Stapleton, F.; Ozkan, J.; Jalbert, I.; Holden, B.A.; Petsoglou, C.; McClellan, K. Contact Lens-Related Acanthamoeba Keratitis. *Optom Vis Sci* **2009**, *86*, E1196-1201, doi:10.1097/OPX.0b013e3181baae11.
89. Kandori, M.; Inoue, T.; Shimabukuro, M.; Hayashi, H.; Hori, Y.; Maeda, N.; Tano, Y. Four Cases of Acanthamoeba Keratitis Treated with Phototherapeutic Keratectomy. *Cornea* **2010**, *29*, 1199–1202, doi:10.1097/ICO.0b013e3181d3d674.
90. Kim, E.C.; Kim, M.S. Bilateral Acanthamoeba Keratitis after Orthokeratology. *Cornea* **2010**, *29*, 680–682, doi:10.1097/ICO.0b013e3181861bf9.
91. Lee, B.; Grossniklaus, H.E.; Edelhauser, H.F. Concurrent Acanthamoeba and Fusarium Keratitis with Silicone Hydrogel Contact Lens Use. *Cornea* **2010**, *29*, 210–213, doi:10.1097/ICO.0b013e3181a1648b.
92. Alfawaz, A. Radial Keratoneuritis as a Presenting Sign in Acanthamoeba Keratitis. *Middle East Afr J Ophthalmol* **2011**, *18*, 252–255, doi:10.4103/0974-9233.84062.
93. Ferrari, G.; Matuska, S.; Rama, P. Double-Biguanide Therapy for Resistant Acanthamoeba Keratitis. *Case Rep Ophthalmol* **2011**.
94. Itahashi, M.; Higaki, S.; Fukuda, M.; Mishima, H.; Shimomura, Y. Utility of Real-Time Polymerase Chain Reaction in Diagnosing and Treating Acanthamoeba Keratitis. *Cornea* **2011**, *30*, 1233–1237, doi:10.1097/ICO.0b013e3182032196.
95. Moreno-Montañés, J.; Barrio-Barrio, J.; De-Nova, E.; Werner, L. Lens Epithelial Cell Death Secondary to Acanthamoeba Keratitis: Absence of Capsular Bag Opacification Six Years after Cataract Surgery. *Case Rep Ophthalmol* **2011**, *2*, 354–359, doi:10.1159/000334785.
96. Arnalich-Montiel, F.; Almendral, A.; Arnalich, F.; Valladares, B.; Lorenzo-Morales, J. Mixed Acanthamoeba and Multidrug-Resistant Achromobacter Xyloxydans in Late-Onset Keratitis after Laser in Situ Keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* **2012**, *38*, 1853–1856, doi:10.1016/j.jcrs.2012.08.022.
97. Li, M.-L.; Shih, M.-H.; Huang, F.-C.; Tseng, S.-H.; Chen, C.-C. Treatment of Early Acanthamoeba Keratitis with Alcohol-Assisted Epithelial Debridement. *Cornea* **2012**, *31*, 442–446, doi:10.1097/ICO.0b013e31823f091a.
98. Greenwell, T.H.; Loh, R.S.; Chehade, M.; Mills, R.A.D. Misdiagnosis of Orthokeratology-Related Acanthamoeba Keratitis as Herpes Simplex Virus Keratitis. *Clin Exp Ophthalmol* **2013**, *41*, 418–420, doi:10.1111/ceo.12047.
99. Patel, D.V.; McGhee, C.N. Presumed Late Recurrence of Acanthamoeba Keratitis Exacerbated by Exposure to Topical Corticosteroids. *Oman J Ophthalmol* **2013**, *6*, S40–S42, doi:10.4103/0974-620X.122295.
100. Van Zyl, L.M.; Andrew, N.; Chehade, M.; Sadlon, T.A.; Badenoch, P.R. Acanthamoeba Lenticulata Keratitis in a Hard Contact Lens Wearer. *Clin Exp Ophthalmol* **2013**, *41*, 810–812, doi:10.1111/ceo.12104.
101. Arance-Gil, Á.; Gutiérrez-Ortega, Á.R.; Villa-Collar, C.; Nieto-Bona, A.; Lopes-Ferreira, D.; González-Méijome, J.M. Corneal Cross-Linking for Acanthamoeba Keratitis in an Orthokeratology Patient after

- Swimming in Contaminated Water. *Cont Lens Anterior Eye* **2014**, *37*, 224–227, doi:10.1016/j.clae.2013.11.008.
102. Tran, T.; Samarawickrama, C.; Petsoglou, C.; Watson, S. Recent Cluster of Childhood Microbial Keratitis Due to Orthokeratology. *Clin Exp Ophthalmol* **2014**, *42*, 793–794, doi:10.1111/ceo.12302.
 103. Igras, E.; Murphy, C. Use of Multiple Immunosuppressive Agents in Recalcitrant Acanthamoeba Scleritis. *BMJ Case Rep* **2015**, *2015*, bcr2014208536, doi:10.1136/bcr-2014-208536.
 104. Mateo, A.; Abadía, B.; Calvo, P.; Minguez, E.; Pablo, L.; Del Castillo, J.M.B. Treatment of Acanthamoeba Neurotrophic Corneal Ulcer with Topical Matrix Therapy. *J Ophthalmic Inflamm Infect* **2015**, *5*, 18, doi:10.1186/s12348-015-0048-x.
 105. Sengor, T.; Kurna, S.A.; Altun, A.; Irkeç, M.; Aki, S.F.; Aksoy, S. Contact Lens-Related Acanthamoeba Keratitis and Accompanying Dacryoadenitis. *Eye Contact Lens* **2015**, *41*, 204–209, doi:10.1097/ICL.0000000000000114.
 106. Ferreira Mendes, J.; Monteiro, T. Pseudodendritic Ulcer. *J Fr Ophthalmol* **2017**, *40*, 341–342, doi:10.1016/j.jfo.2016.12.015.
 107. Hou, T.-Y.; Chen, Y.-C.; Hsu, C.-C. Rapid Resolution of Stromal Keratitis with the Assistance of Oral Voriconazole in Resistant Acanthamoeba Keratitis. *Taiwan J Ophthalmol* **2017**, *7*, 224–226, doi:10.4103/tjo.tjo_73_17.
 108. Kwok, P.W.R.; Kam, K.W.; Jhanji, V.; Young, A.L. Painless Acanthamoeba Keratitis with Normal Vision. *Optom Vis Sci* **2017**, *94*, 432–435, doi:10.1097/OPX.0000000000001023.
 109. Sengor, T.; Yuzbasioglu, E.; Aydın Kurna, S.; Irkeç, M.; Altun, A.; Kökçen, K.; Yalcin, N.G. Dacryoadenitis and Extraocular Muscle Inflammation Associated with Contact Lens-Related Acanthamoeba Keratitis: A Case Report and Review of the Literature. *Orbit* **2017**, *36*, 43–47, doi:10.1080/01676830.2016.1243132.
 110. Buchele, M.L.C.; Wopereis, D.B.; Casara, F.; de Macedo, J.P.; Rott, M.B.; Monteiro, F.B.F.; Bazzo, M.L.; Dos Reis Spada, F.; Dos Santos, J.I.; Caumo, K.S. Contact Lens-Related Polymicrobial Keratitis: Acanthamoeba Spp. Genotype T4 and Candida Albicans. *Parasitol Res* **2018**, *117*, 3431–3436, doi:10.1007/s00436-018-6037-x.
 111. De Borja Domínguez-Serrano, F.; Caro-Magdaleno, M.; Perea-Pérez, R.; Rodríguez-de-la-Rúa, E.; Montero-Iruzubieta, J. Case Report: Acanthamoeba Keratitis Management in a First-Trimester Pregnant Patient. *Optom Vis Sci* **2018**, *95*, 411–413, doi:10.1097/OPX.0000000000001206.
 112. Mohammadpour, M.; Rahimi, F.; Khorrami-Nejad, M. Total Necrosis of Cornea, Iris and Crystalline Lens with Exposure of Vitreous Hyaloid Face in the Context of Recalcitrant Acanthamoeba Keratitis. *J Curr Ophthalmol* **2018**, *30*, 377–380, doi:10.1016/j.joco.2018.02.006.
 113. Tan, E.M.; Starr, M.R.; Henry, M.R.; Pritt, B.S. The Brief Case: A “Fresh” Pair of Contact Lenses. *J Clin Microbiol* **2018**, *56*, e00790-17, doi:10.1128/JCM.00790-17.
 114. Dewan, N.; Ming, W.; Holland, S.P.; Yeung, S.N.; Iovieno, A. Oral Miltefosine as Adjunctive Treatment for Recalcitrant Acanthamoeba Keratitis. *Cornea* **2019**, *38*, 914–917, doi:10.1097/ICO.0000000000001968.
 115. Hsu, C.-C. Dendrite-like Anterior Stromal Keratitis Coinfected with Acanthamoeba and Pseudomonas in an Orthokeratology Contact Lens Wearer. *Taiwan J Ophthalmol* **2019**, *9*, 131–133, doi:10.4103/tjo.tjo_114_17.
 116. Singh, A.; Acharya, M.; Jose, N.; Gandhi, A.; Sharma, S. 18S rDNA Sequencing Aided Diagnosis of Acanthamoeba Jacobsi Keratitis -A Case Report. *Indian J Ophthalmol* **2019**, *67*, 1886–1888, doi:10.4103/ijo.IJO_2019_18.
 117. Al-Yousuf, N.; Sindi, K.A.; Hashem, S.; Alsetri, H.; Dombroski, C. Atypical Presentation of Acanthamoeba Keratitis in a Contact Lens Wearer. *Open Journal of Ophthalmology* **2020**, *10*, 261–267, doi:10.4236/ojoph.2020.104028.
 118. Cubuk, M.O.; Al, F.D.; Usluca, S.; Bilgihan, K. Acanthamoeba Keratitis Associated with Scleral Contact Lens Use in a Keratoconus Patient. *Beyoglu Eye J* **2020**, *5*, 53–56, doi:10.14744/bej.2019.99609.
 119. Hsu, C.-W.; Liu, C.-H.; Hsiao, C.-H. Corneal Endotheliitis as a Presentation of Acanthamoeba Keratitis. *Eye Contact Lens* **2020**, *46*, e30–e32, doi:10.1097/ICL.0000000000000633.
 120. Lee, M.J.; Srikumaran, D.; Zafar, S.; Salehi, M.; Liu, T.S.; Woreta, F.A. Case Series: Delayed Diagnoses of Acanthamoeba Keratitis. *Am J Ophthalmol Case Rep* **2020**, *19*, 100778, doi:10.1016/j.ajoc.2020.100778.

121. Al-Motowa, S.; AlMutawa, S.; Al-Kadi, T. Early Therapeutic Lamellar Keratoplasty for Acanthamoeba Keratitis Followed by Implantable Collamer Lens for Visual Rehabilitation. *Middle East Afr J Ophthalmol* **2020**, *27*, 244–246, doi:10.4103/meajo.meajo_557_20.
122. Korkmaz, I.; Barut Selver, O.; Simsek, C.; Palamar, M. Negative Corneal Fluorescein Staining as an Exceptionally Early Sign of Acanthamoeba Keratitis: A Case Report. *Eye Contact Lens* **2021**, *47*, 622–624, doi:10.1097/ICL.0000000000000825.
123. Raghavan, A.; Nair, A.V.; N, K.; Venkatapathy, N.; Rammohan, R. Voriconazole in the Successful Management of a Case of Acanthamoeba-Cladosporium Keratitis. *Am J Ophthalmol Case Rep* **2021**, *22*, 101107, doi:10.1016/j.ajoc.2021.101107.
124. Roszkowska, A.M.; Severo, A.A.; Biondo, C.; Postorino, E.I.; Inferrera, L.; Aragona, P. Combined *Phialemonium Curvatum* and Acanthamoeba Keratitis: The Importance of Early Diagnosis and Specific Therapy. *Cornea* **2021**, *40*, 1340–1343, doi:10.1097/ICO.0000000000002660.
125. Wu, J.; Xie, H. Orthokeratology Lens-Related Acanthamoeba Keratitis: Case Report and Analytical Review. *J Int Med Res* **2021**, *49*, 03000605211000985, doi:10.1177/03000605211000985.
126. Lee, P.-Y.; Lin, C.-C.; Chiu, L.-Y.; Lee, P.-Y. Bilateral Radial Keratoneuritis Resulting from Acanthamoeba Keratitis. *Kaohsiung J Med Sci* **2022**, *38*, 79–80, doi:10.1002/kjm2.12446.
127. List, W.; Glatz, W.; Riedl, R.; Mossboeck, G.; Steinwender, G.; Wedrich, A. Evaluation of Acanthamoeba Keratitis Cases in a Tertiary Medical Care Centre over 21 Years. *Sci Rep* **2021**, *11*, 1036, doi:10.1038/s41598-020-80222-3.
128. Awwad, S.T.; Parmar, D.N.; Heilman, M.; Bowman, R.W.; McCulley, J.P.; Cavanagh, H.D. Results of Penetrating Keratoplasty for Visual Rehabilitation after Acanthamoeba Keratitis. *Am J Ophthalmol* **2005**, *140*, 1080–1084, doi:10.1016/j.ajo.2005.07.031.

MANUSCRIPT IN PROGRESS

Discussion générale

I. Synthèse des résultats

Notre méta-analyse a montré que le taux de guérison des patients avec un traitement comportant de la CLX en monothérapie ou associée à une diamine (propamidine ou hexamidine) était comparable à celui du groupe dont le traitement comportait du PHMB en monothérapie ou associé à une diamine. En associant biguanide et diamine, les taux de guérison n'étaient pas non plus significativement différents d'un traitement par biguanide seul. Le taux de guérison du groupe traité par PHMB et CLX combinés n'était pas significativement différent des autres. Cependant, pour les patients guéris, la durée du traitement était significativement plus courte avec la CLX en monothérapie comparée au PHMB en monothérapie ou comparée à la CLX associée à une diamine. Concernant la différence d'acuité visuelle avant et après traitement, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes de traitement étudiés.

II. Discussion des résultats

Le taux de guérison global de notre étude (90,12 %) est conforme à celui retrouvé dans la littérature scientifique (32,55,88). En outre, la seule étude randomisée comparant CLX et PHMB en monothérapie ne montrait pas de différence significative concernant le taux de guérison ni concernant la durée du traitement contrairement à notre travail (55). De plus, nous attendions pour l'association PHMB + CLX à obtenir un taux de guérison supérieur aux autres groupes de traitements étudiés, par synergie d'action entre les deux molécules, mais aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence. Cela peut s'expliquer par une utilisation de cette association pour les KA compliquées, plus difficiles à traiter (89,90). En associant une diamine à la CLX, le taux de guérison n'est pas amélioré et la durée du traitement est rallongée : une de nos hypothèses est une possible interaction avec le Brolene® et la Désoméline® qui contiennent des ions chlorures dans leurs excipients. En effet, la CLX qui est un cation, présente une incompatibilité physico-chimique avec certains anions comme les chlorures ou les hypochlorites. Il a en effet été démontré que la CLX précipitait en présence d'ions chlorures, ce qui pourrait expliquer une diminution de l'efficacité (91). Une autre hypothèse est une amélioration de l'efficacité du PHMB en présence de diamine, permettant d'obtenir des temps de traitement comparables à ceux obtenus avec la CLX seule. Nos résultats sont en accord avec les durées de traitement retrouvées dans les études de cas et études rétrospectives (88,92). Toutefois, les durées de traitement constatées dans les études randomisées sont bien inférieures (55,67). On pourrait expliquer cela par le suivi plus

rigoureux des patients inclus dans ce type d'étude ou, dans certains cas, par une méthode de diagnostic et de suivi novatrice.

La récupération de l'acuité visuelle des patients dans les différents groupes est en adéquation avec ce qui était attendu : les collyres composés de biguanides étant efficaces pour traiter la KA, il est donc logique de retrouver une augmentation moyenne de l'acuité visuelle après traitement. Cependant, malgré la guérison de l'infection, il est plus difficile de considérer ce paramètre pour comparer l'efficacité des collyres sur une KA, car certains patients guéris (par éradication des parasites) n'ont aucune amélioration après traitement à cause des séquelles et ont souvent recours dans ce cas à une kératoplastie (93,94).

III. Limites du travail expérimental

Pour cette méta-analyse, les résultats sont basés sur 211 patients pour lesquels les données individualisées étaient disponibles. Les résultats concernant la durée du traitement sont basés sur 171 patients guéris parmi ces 211 individus. Pour l'acuité visuelle, les résultats étaient disponibles de manière individualisée chez 143 patients. Les résultats complémentaires de 397 patients seront ajoutés prochainement à cette méta-analyse grâce aux études dont les données sont groupées.

Nous n'avons pas abordé les résistances au traitement par biguanide dans cette méta-analyse, mais en réalisant notre revue de la littérature, il a été mis en évidence que des cliniciens avaient traité avec succès des KA résistantes grâce à des concentrations plus importantes en biguanides (jusqu'à 0,06 %) sans effets indésirables majeurs (95–98). Une autre possibilité mise en avant est l'association de PHMB et CLX qui a montré son efficacité avec tolérance acceptable (67,90,99). En cas de résistance aux biguanides, des molécules de deuxième ligne qui ont montré une efficacité clinique peuvent être administrées : c'est le cas du voriconazole en collyre à 1 % (67,68) ou *per os* (69) et de l'itraconazole *per os* (72). Notre méta-analyse n'a pas étudié l'effet de ces antifongiques sur le traitement de la KA, que ce soit en monothérapie ou associés aux biguanides.

Dans ce travail expérimental, nous n'avons pas pu évaluer l'efficacité des collyres en fonction des concentrations administrées car trop peu de patients étaient traités avec des concentrations différentes de 0,02 % pour les biguanides et 0,1 % pour les diamines (4,6 % du total soit 28 patients). Les concentrations administrées restent cependant supérieures aux concentrations minimales kysticides en ce qui concerne les biguanides et supérieures aux concentrations amoebicide minimale des trophozoïtes concernant les diamines. L'efficacité des autres concentrations serait à évaluer. Les concentrations les plus hautes pourraient permettre de raccourcir la durée du traitement avec un risque d'effets indésirables plus important tandis que les concentrations plus basses, si elles sont efficaces pourraient diminuer ce risque.

Cette méta-analyse n'a pas évalué la toxicité des biguanides et leur tolérance car les paramètres cliniques pour les évaluer sont des données parfois subjectives comme les douleurs ou les démangeaisons. Les paramètres étudiés sont différents en fonction des études (degré de cicatrisation de la cornée, congestion du chémosis et de la conjonctive, kératite ponctuée superficielle), et trop peu souvent décrits pour être analysés statistiquement. Une étude randomisée pour comparer l'efficacité de collyres de CLX par rapport à la natamycine pour traiter des kératites fongiques a mis en évidence l'absence de toxicité de la CLX pour des concentrations de 0,05 %, 0,1 % et 0,2 % (82). Une étude *in vitro* sur des kératinocytes de cornée humaine a montré moins de toxicité de la CLX par rapport au PHMB (83) pour une concentration de 0,02 % chacun. Toutefois, un cas d'ulcère cornéen imputable à la CLX a été décrit en 2002 (100). Pour évaluer la toxicité d'un collyre, le temps de contact est également important. Il est cependant difficile de réaliser un modèle *in vitro* si l'on veut prendre en compte le drainage et la dilution des substances présentes à la surface de l'œil par le flux lacrymal et via le canal lacrymonasal (101).

IV. Contexte local et ouverture

L'absence de spécialité disponible sur le marché pour traiter la KA conduit les PUI à préparer des collyres pour éviter une impasse thérapeutique. La mise en œuvre de préparations pharmaceutiques stériles comme des collyres nécessite des locaux adaptés ainsi qu'un personnel qualifié et disponible. Historiquement, les collyres de PHMB étaient préparés à partir de matière première à usage pharmaceutique (MPUP). Le PHMB sous forme de MPUP étant en rupture mondiale d'approvisionnement depuis plusieurs années, il a donc été nécessaire de trouver des alternatives pour éviter une perte de chance aux patients atteints de KA. Parmi les alternatives existantes, il est possible de préparer des collyres de PHMB à partir de solutions antiseptiques et considérées comme des dispositifs médicaux stériles. Or, dans ces conditions, les données concernant qualité de la matière première ne sont pas aussi fournies que s'il s'agissait d'une MPUP. Devant l'urgence thérapeutique, en l'absence d'alternative et en concertation avec les ophtalmologues du CHU de Clermont-Ferrand, la balance bénéfices/risques a été jugée en faveur de la préparation d'un collyre à partir de solution antiseptique à base de PHMB ayant le statut de dispositif médical stérile. Une autre alternative envisagée à plus long terme serait la préparation de collyres de CLX à partir de la MPUP. La mise au point d'une formulation de collyre, d'une méthode séparative pour quantifier efficacement la CLX et la réalisation d'une étude de la stabilité physico-chimique pourrait permettre, en fonction des résultats obtenus, de palier à la rupture de PHMB en proposant une alternative thérapeutique. Dans de précédents travaux, nous avons réalisé une étude préliminaire de la stabilité physique d'un collyre de digluconate de CLX dans du tampon phosphate. Nos résultats

avaient montré la stabilité physique de ce collyre à température ambiante et réfrigérée pendant 2 mois. Ce travail a fait l'objet d'une communication écrite au Congrès du GERPAC 2021 (disponible en Annexe 1). Une étude de la stabilité physico-chimique de cette préparation reste cependant nécessaire et devra faire l'objet d'un futur travail. L'étude de l'efficacité *in vitro* d'un tel collyre sur les amibes pourrait également s'avérer intéressante.

Conclusion

La CLX semble être une alternative au moins aussi efficace que le PHMB d'après les paramètres étudiés : taux de guérison, durée de traitement et récupération de l'acuité visuelle. Néanmoins, notre méta-analyse n'a pas étudié la toxicité des biguanides et les données cliniques sont peu nombreuses concernant ce paramètre. Les données relevées dans la littérature et dans notre travail d'analyse nous permettent de douter de l'intérêt d'associer un biguanide à une diamine, du moins en première intention. L'efficacité *in vitro* d'un collyre de CLX comparé au collyre de PHMB pourrait faire l'objet d'une étude par la suite. Enfin, une étude de la stabilité physico-chimique d'un collyre de digluconate de CLX dont nous aurons mis au point la formulation est envisagée, en nous appuyant sur nos précédents travaux concernant sa stabilité physique.

Le Doyen de l'UFR de Pharmacie,
Christiane FORESTIER

Le Président du jury,
Valérie SAUTOU

Références bibliographiques

1. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. 2012;5:6.
2. Bowers B, Korn ED. Cytochemical identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol*. 1973;59(3):784- 91.
3. Ulsamer AG, Wright PL, Wetzel MG, Korn ED. Plasma and phagosome membranes of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol*. 1971;51(1):193- 215.
4. Preston TM, Richards H, Wotton RS. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Microbiol Lett*. 15 janv 2001;194(2):143- 7.
5. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(2):273- 307.
6. Tomlinson G, Jones EA. Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1962;63(1):194- 200.
7. Illingworth CD, Cook SD. *Acanthamoeba* keratitis. *Surv Ophthalmol*. 1998;42(6):493- 508.
8. Dart JKG, Saw VPJ, Kilvington S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(4):487-499.e2.
9. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;22:10.
10. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2012;59(5):429- 93.
11. Semaha S. Les kératites infectieuses: manifestations cliniques et prise en charge. Marseille; 2020.
12. Visvesvara GS. Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*. 1991;13 Suppl 5:S369-372.
13. Stothard DR, Hay J, Schroeder-Diedrich JM, Seal DV, Byers TJ. Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2687- 93.
14. Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet*. 1974;2(7896):1537- 40.
15. De Lacerda AG, Lira M. *Acanthamoeba* keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2021;41(1):116- 35.
16. Radford CF, Lehmann OJ, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(12):1387- 92.
17. Stehr-Green JK, Bailey TM, Visvesvara GS. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol*. 1989;107(4):331- 6.

18. Kobayashi T, Gibbon L, Mito T, Shiraiishi A, Uno T, Ohashi Y. Efficacy of commercial soft contact lens disinfectant solutions against *Acanthamoeba*. *Jpn J Ophthalmol*. sept 2011;55(5):547- 57.
19. Randag AC, van Rooij J, van Goor AT, Verkerk S, Wisse RPL, Saelens IEY, et al. The rising incidence of *Acanthamoeba* keratitis: A 7-year nationwide survey and clinical assessment of risk factors and functional outcomes. *PLoS One*. 2019;14(9):e0222092.
20. Sharma S, Garg P, Rao GN. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*. oct 2000;84(10):1103- 8.
21. Panjwani N. Pathogenesis of *acanthamoeba* keratitis. *Ocul Surf*. 2010;8(2):70- 9.
22. Clarke B, Sinha A, Parmar DN, Sykakis E. Advances in the diagnosis and treatment of *acanthamoeba* keratitis. *J Ophthalmol*. 2012;2012:484892.
23. Lonnen J, Heaselgrave W, Nomachi M, Mori O, Santodomingo-Rubido J. Disinfection efficacy and encystment rate of soft contact lens multipurpose solutions against *Acanthamoeba*. *Eye Contact Lens*. 2010;36(1):26- 32.
24. Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer DG, et al. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(1):165- 9.
25. Sanchez S, Faraj LA, Wajnsztajn D, Dart JKG, Milligan AL. *Acanthamoeba* more commonly causes epithelial keratitis than herpes simplex in South-East England contact lens users. *Infection*. 2022;
26. McKelvie J, Alshiakhi M, Ziaei M, Patel DV, McGhee CN. The rising tide of *Acanthamoeba* keratitis in Auckland, New Zealand: a 7-year review of presentation, diagnosis and outcomes (2009-2016). *Clin Exp Ophthalmol*. 2018;46(6):600- 7.
27. Bacon AS, Frazer DG, Dart JK, Matheson M, Ficker LA, Wright P. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. *Eye (Lond)*. 1993;7 (Pt 6):719- 25.
28. Anatomie de la cornée [Internet]. Disponible sur: <https://images.ctfassets.net/u4vv676b8z52/5ItHsnyfyNjzGFie8wEpWK/480bdd80980f05689d0d74d6bb4eed68/cornea-678x446-fr-ca.gif?fm=jpg&q=80>
29. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitology*. 2006;22(4):175- 80.
30. Yang YF, Matheson M, Dart JK, Cree IA. Persistence of *acanthamoeba* antigen following *acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(3):277- 80.
31. Bouheraoua N, Labbé A, Chaumeil C. Kératites amibiennes. *J Fr Ophtalmol*. 2014;(37):640- 52.
32. Megha K, Thakur A, Khurana S, Sehgal R, Gupta A. *Acanthamoeba* keratitis: A 4-year

- review from a tertiary care hospital in North India. *Nepal J Ophthalmol.* 2020;12(23):83- 90.
33. Kwok PWR, Kam KW, Jhanji V, Young AL. Painless Acanthamoeba Keratitis with Normal Vision. *Optom Vis Sci.* 2017;94(3):432- 5.
34. Dougherty PJ, Binder PS, Mondino BJ, Glasgow BJ. Acanthamoeba sclerokeratitis. *Am J Ophthalmol.* 1994;117(4):475- 9.
35. Papa V, Rama P, Radford C. Acanthamoeba keratitis therapy: time to cure and visual outcome analysis for different antiamebic therapies in 227 cases. *Bj ophtalmol.* 2019;104(4):575- 81.
36. Maycock NJR, Jayaswal R. Update on Acanthamoeba Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Cornea.* 2016;35(5):713- 20.
37. Borin S, Feldman I, Ken-Dror S. Rapid diagnosis of acanthamoeba keratitis using non-nutrient agar with a lawn of E. coli. *J Ophthalmic Inflamm Infect [Internet].* 2013; Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23514313/>
38. Parmar DN, Awwad ST, Petroll WM, Bowman RW, McCulley JP, Cavanagh HD. Tandem scanning confocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology.* 2006;113(4):538- 47.
39. Muiño L, Rodrigo D, Villegas R. Effectiveness of sampling methods employed for Acanthamoeba keratitis diagnosis by culture. *Int Ophthalmol.* 2019;39(7):1451- 8.
40. Latifi A, Salimi M. Growth comparison of Acanthamoeba genotypes T3 and T4 in several culture media. *Heliyon.* 2020;6(9):e04805.
41. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):1903- 11.
42. Yera H, Ok V, Lee Koy Kuet F, Dahane N, Ariey F, Housseine L, et al. PCR and culture for diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *Br J Ophthalmol.* 2021;105(9):1302- 6.
43. Rapport SFO 2015 - Surface oculaire [Internet]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100018.html
44. Gueudry J, courville P, Muraine M. Intérêt de la biopsie cornéenne dans les kératites amibiennes sévères. *Images en ophtalmologie.* 2011;5(1):26- 8.
45. Penetrating keratoplasty [Internet]. Disponible sur: https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-1-4614-5644-5_18/MediaObjects/308147_1_En_18_Fig1_HTML.jpg
46. Larkin DF, Kilvington S, Dart JK. Treatment of Acanthamoeba keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology.* 1992;99(2):185- 91.
47. Hay J, Kirkness CM, Seal DV. Drug resistance and Acanthamoeba keratitis: the quest for

alternative antiprotozoal chemotherapy. *Eye (Lond)*. 1994;8(5):555- 63.

48. Hernández-Martínez D, Reyes-Batlle M, Castelan-Ramírez I. Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. *Exp Parasitol*. 2019;197:29- 35.

49. Kilvington S, Hughes R, Byas J, Dart J. Activities of therapeutic agents and myristamidopropyl dimethylamine against *Acanthamoeba* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):2007- 9.

50. Elder MJ, Kilvington S, Dart JK. A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(3):1059- 64.

51. Sunada A, Kimura K, Nishi I. In vitro evaluations of topical agents to treat *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*. 2014;121(10):2059- 65.

52. Eun-Kyung M, Eun-Kyung C, Hyun-Hee K. Polyhexamethylene biguanide and chloroquine induce programmed cell death in *Acanthamoeba castellanii*. *Exp Parasitol*. 2018;191:31- 5.

53. Nassef, El Emmam, El Shorbagy. *Acanthamoeba* Keratitis in Egypt: Characteristics and Treatment Outcomes. *Clin ophthalmol*. 2021;29(15):1339- 47.

54. Bonini S, Di Zazzo A, Varacalli G, Coassin M. *Acanthamoeba* Keratitis: Perspectives for Patients. *Curr Eye Res*. 2021;46(6):771- 6.

55. Lim N, Goh D, Bunce C, Xing W, Fraenkel G, Poole TRG, et al. Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2008;145(1):130- 5.

56. *Acanthamoeba* Keratitis Fact Sheet for Healthcare Professionals [Internet]. Centers for disease control and prevention. Disponible sur: https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/health_professionals/acanthamoeba_keratitis_hcp.html

57. Szczotka-Flynn LB, Shovlin JP, Schnider CM, Caffery BE, Alfonso EC, Carnt NA, et al. American Academy of Optometry Microbial Keratitis Think Tank. *Optom Vis Sci*. 2021;98(3):182- 98.

58. Chlorhexidine [Internet]. Disponible sur: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5b/Chlorhexidine.png/1200px-Chlorhexidine.png>

59. Polyhexanide [Internet]. Disponible sur: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0b/Polyhexanide.svg/1200px-Polyhexanide.svg.png>

60. Perrine D, Chenu JP, Georges P, Lancelot JC, Saturnino C, Robba M. Amoebicidal efficiencies of various diamidines against two strains of *Acanthamoeba* polyphaga. *Antimicrob*

Agents Chemother. 1995;39(2):339- 42.

61. Murdoch D, Gray TB, Cursons R, Parr D. Acanthamoeba keratitis in New Zealand, including two cases with in vivo resistance to polyhexamethylene biguanide. Aust N Z J Ophthalmol. 1998;26(3):231- 6.

62. List W, Glatz W, Riedl R, Mossboeck G, Steinwender G, Wedrich A. Evaluation of Acanthamoeba keratitis cases in a tertiary medical care centre over 21 years. Sci Rep. 2021;11(1):1036.

63. McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Effect of steroids on Acanthamoeba cysts and trophozoites. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42(12):2885- 93.

64. Seal DV. Acanthamoeba keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. Eye (Lond). 2003;17(8):893- 905.

65. Kaiserman I, Bahar I, McAllum P, Srinivasan S, Elbaz U, Slomovic AR, et al. Prognostic factors in Acanthamoeba keratitis. Can J Ophthalmol. 2012;47(3):312- 7.

66. Gueudry J, Le Goff L, Compagnon P, Lefevre S, Colasse E, Aknine C, et al. Evaluation of voriconazole anti-Acanthamoeba polyphaga in vitro activity, rat cornea penetration and efficacy against experimental rat Acanthamoeba keratitis. J Antimicrob Chemother. 2018;73(7):1895- 8.

67. Bagga B, Sharma S, Gour RPS, Mohamed A, Joseph J, M Rathi V, et al. A randomized masked pilot clinical trial to compare the efficacy of topical 1% voriconazole ophthalmic solution as monotherapy with combination therapy of topical 0.02% polyhexamethylene biguanide and 0.02% chlorhexidine in the treatment of Acanthamoeba keratitis. Eye (Lond). 2021;35(5):1326- 33.

68. Bang S, Edell E, Eghrari AO, Gottsch JD. Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant Acanthamoeba keratitis. Am J Ophthalmol. 2010;149(1):66- 9.

69. Tu EY, Joslin CE, Shoff ME. Successful treatment of chronic stromal acanthamoeba keratitis with oral voriconazole monotherapy. Cornea. 2010;29(9):1066- 8.

70. Bouyer S, Imbert C, Daniault G, Cateau E, Rodier MH. Effect of caspofungin on trophozoites and cysts of three species of Acanthamoeba. J Antimicrob Chemother. janv 2007;59(1):122- 4.

71. Naranjo A, Martinez DM. Systemic Miltefosine as an Adjunct Treatment of Progressive Acanthamoeba Keratitis. Ocul Immunol Inflamm. 2021;29(7- 8):1576- 84.

72. Kaufman AR, Tu EY. Advances in the management of Acanthamoeba keratitis: A review of the literature and synthesized algorithmic approach. Ocul Surf. 2022;25:26- 36.

73. D'Amico DJ, Caspers-Velu L, Libert J, Shanks E, Schrooyen M, Hanninen LA, et al. Comparative toxicity of intravitreal aminoglycoside antibiotics. Am J Ophthalmol. 1985;100(2):264- 75.

74. Sharma S, Srinivasan M, George C. Acanthamoeba keratitis in non-contact lens wearers.

Arch Ophthalmol. 1990;108(5):676- 8.

75. Sharma R, Jhanji V, Satpathy G, Sharma N, Khokhar S, Agarwal T. Coinfection with Acanthamoeba and Pseudomonas in contact lens-associated keratitis. Optom Vis Sci. 2013;90(2):e53-55.

76. Hargrave SL, McCulley JP, Hussein Z. Results of a trial of combined propamidine isethionate and neomycin therapy for Acanthamoeba keratitis. Br J Ophthalmol. 1999;106(5):952- 7.

77. Nadia BA, Anis M, Ali SM, Ahmed M, Sana R, Mohamed G, et al. Acanthamoeba keratitis in contact lens wearers in a tertiary center of Tunisia, North Africa. Ann Med Surg (Lond). 2021;70:102834.

78. Hadaś E, Derda M, Cholewiński M. Evaluation of the effectiveness of tea tree oil in treatment of Acanthamoeba infection. Parasitol Res. 2017;116(3):997- 1001.

79. Cristian C, Marco CDV, Arturo K, Claudio P, Miguel S, Rolf R, et al. Accelerated collagen cross-linking in the management of advanced Acanthamoeba keratitis. Arq Bras Oftalmol. 2019;82(2):103- 6.

80. Turner NA, Russell AD, Furr JR, Lloyd D. Emergence of resistance to biocides during differentiation of Acanthamoeba castellanii. J Antimicrob Chemother. 2000;46(1):27- 34.

81. Seal D, Hay J, Kirkness C, Morrell A, Booth A, Tullo A, et al. Successful medical therapy of Acanthamoeba keratitis with topical chlorhexidine and propamidine. Eye (Lond). 1996;10 (Pt 4):413- 21.

82. Rahman MR, Minassian DC, Srinivasan M, Martin MJ, Johnson GJ. Trial of chlorhexidine gluconate for fungal corneal ulcers. Ophthalmic Epidemiol. 1997;4(3):141- 9.

83. Lee JE, Oum BS, Choi HY, Yu HS, Lee JS. Cysticidal effect on acanthamoeba and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. Cornea. 2007;26(6):736- 41.

84. Carrijo-Carvalho LC, Sant'ana VP, Foronda AS, de Freitas D, de Souza Carvalho FR. Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of Acanthamoeba genus. Surv Ophthalmol. 2017;62(2):203- 18.

85. COMMISSION REGULATION (EU) 2019/ 831 - of 22 May 2019 - amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 1223 / 2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. 2019;35.

86. Szkołuda P, Karpiński TM. Polyhexanide (PHMB) – properties and applications in medicine. European Journal of Biological Research. 2020;10(3):225- 31.

87. Johnson W, Boyer I, Zhu J, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, et al. Safety Assessment of Polyaminopropyl Biguanide (Polyhexamethylene Biguanide Hydrochloride) as Used in Cosmetics.

Int J Toxicol. 2020;39(3_suppl):26S-73S.

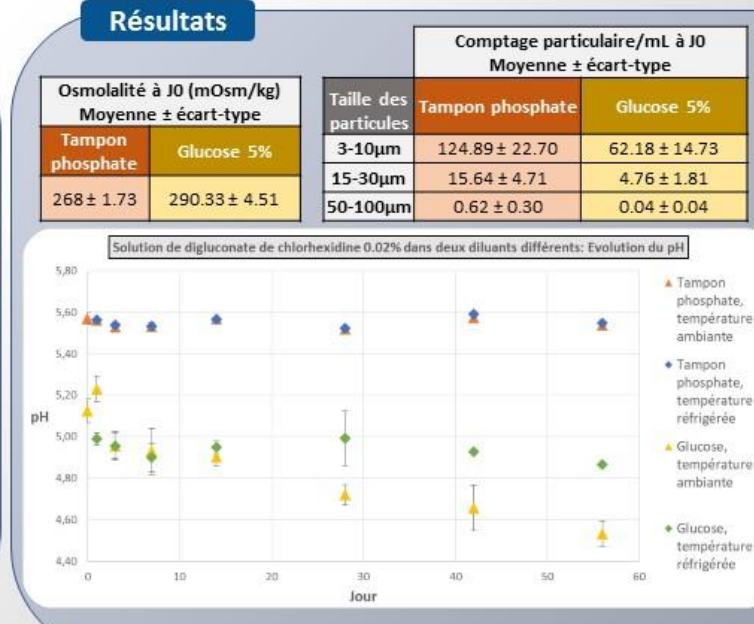
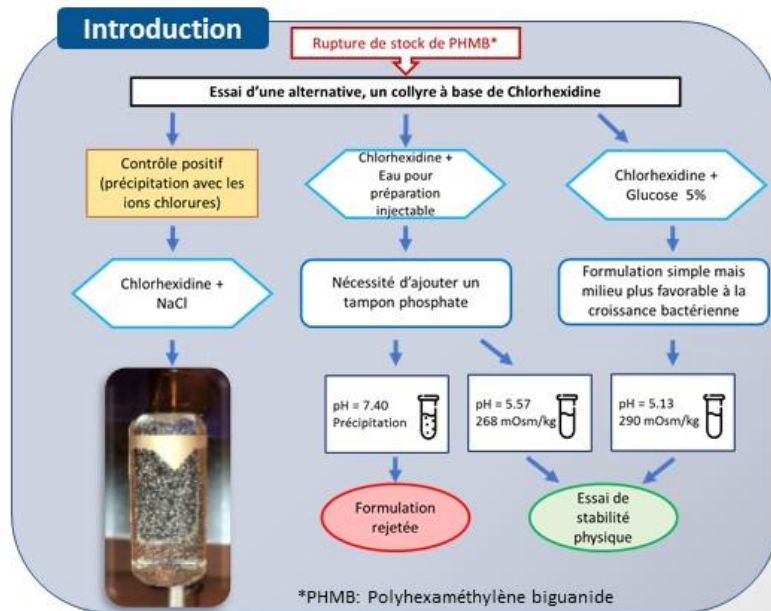
88. Duguid IG, Dart JK, Morlet N, Allan BD, Matheson M, Ficker L, et al. Outcome of acanthamoeba keratitis treated with polyhexamethyl biguanide and propamidine. *Ophthalmology*. 1997;104(10):1587- 92.
89. Lee PY, Lin CC, Chiu LY, Lee PY. Bilateral radial keratoneuritis resulting from acanthamoeba keratitis. *Kaohsiung J Med Sci*. 2022;38(1):79- 80.
90. Ferrari G, Matuska S, Rama P. Double-biguanide therapy for resistant acanthamoeba keratitis. *Case Rep Ophthalmol* [Internet]. 2011 [cité 14 mars 2022]; Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22174703/>
91. Gupta R, Chandavarkar V, Galgali S, Mishra M, Lecturer. *Global Journal of Medicine and Public Health Chlorhexidine, A Medicine for all the Oral Diseases*. 2012;1.
92. Xuguang S, Lin C, Yan Z, Zhiqun W, Ran L, Shiyun L, et al. Acanthamoeba keratitis as a complication of orthokeratology. *Am J Ophthalmol*. 2003;136(6):1159- 61.
93. Yamazoe K, Yamamoto Y, Shimazaki-Den S, Shimazaki J. Visual outcome in Japanese patients with Acanthamoeba keratitis. *Eye (Lond)*. 2012;26(4):517- 22.
94. Awwad ST, Parmar DN, Heilman M, Bowman RW, McCulley JP, Cavanagh HD. Results of penetrating keratoplasty for visual rehabilitation after Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(6):1080- 4.
95. Szentmáry N, Shi L, Daas L, Seitz B. Diagnostics and management approaches for Acanthamoeba keratitis. *Expert Opinion on Orphan Drugs*. 2020;8(7):227- 36.
96. Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, Mishima H, Shimomura Y. Utility of real-time polymerase chain reaction in diagnosing and treating acanthamoeba keratitis. *Cornea*. 2011;30(11):1233- 7.
97. Mathers W. Use of higher medication concentrations in the treatment of acanthamoeba keratitis. *Arch Ophthalmol*. 2006;124(6):923.
98. Hirabayashi KE, Lin CC, Ta CN. Oral miltefosine for refractory Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2019;16:100555.
99. Balasubramanya R, Garg P, Sharma S, Vemuganti GK. Acanthamoeba keratitis after LASIK. *J Refract Surg*. 2006;22(6):616- 7.
100. Murthy S, Hawksworth NR, Cree I. Progressive ulcerative keratitis related to the use of topical chlorhexidine gluconate (0.02%). *Cornea*. 2002;21(2):237- 9.
101. Flux lacrymal [Internet]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100026.html

Annexe 1

Stabilité physique de collyres de digluconate de chlorhexidine 0.02% dans du glucose 5% ou du tampon phosphate à température réfrigérée et à température ambiante

Erwin Lenglet¹, Manon Gareau¹, Léa Savio¹, Mathieu Wasiak¹, Yassine Bouattour^{1,2}, Valérie Sautou^{1,2}, Philip Chennell^{1,2}

1 : CHU Clermont-Ferrand, Pôle Pharmacie, 63000 Clermont-Ferrand, France 2 : Université Clermont Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, CNRS, SIGMA Clermont-Ferrand, ICCF, 63000 Clermont-Ferrand, France



Aucun changement de couleur ni particule macroscopique n'a été détecté.

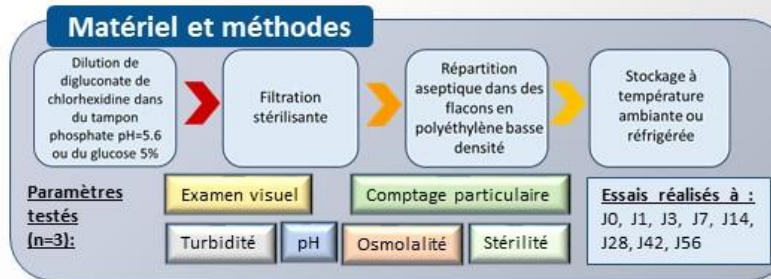
Les quantités de particules subvisibles n'augmentent pas pour chaque diluant avec un stockage à température ambiante mais augmentent légèrement avec un stockage à 5 ± 3°C.

Les valeurs de turbidité sont inférieures à 1.3 FNU.

L'écart maximal de pH par rapport à la moyenne de J0 était de 0.90% avec le tampon phosphate et de 11.54% pour le glucose 5%.

Pour l'osmolalité, l'écart maximal à la moyenne par rapport à J0 était de 6,59%.

La stérilité a été préservée.



Discussion et conclusion

Les solutions de digluconate de chlorhexidine 0.02% n'ont présenté aucune instabilité physique stockées à température ambiante ou réfrigérée dans le tampon phosphate ou le glucose 5% pendant 56 jours. Cela était attendu, car aucun de ces diluants ne contenait d'ions chlorures qui sont incompatibles avec la chlorhexidine. Les solutions de glucose étant des milieux plus favorables à la croissance bactérienne et présentant une acidification au cours de l'étude, le meilleur diluant et la meilleure condition de conservation semblent être le tampon phosphate à température ambiante. Cette étude préliminaire nécessiterait d'être complétée par une étude physicochimique complète avant que toute conclusion soit faite sur sa stabilité globale.



Serment de Galien



En présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

-D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

-D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

-De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et la dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Résumé : La kératite amibienne est une pathologie infectieuse rare mais potentiellement cécitante. Elle est causée par une amibe libre, *Acanthamoeba spp.* Ce protozoaire ubiquitaire possède la capacité de prendre une forme kystique qui lui permet de résister à des conditions environnementales défavorables ainsi qu'à de nombreuses molécules. Il n'existe aucune spécialité ayant une AMM (autorisation de mise sur le marché) dans cette indication en France ou dans le monde, c'est pour cela que les collyres sont généralement préparés en PUI (Pharmacie d'usage intérieur) au CHU. Devant le manque de données cliniques et le risque de rupture d'approvisionnement concernant certaines matières premières, nous proposons une synthèse des différents traitements médicamenteux existants, en rapport avec les données récentes de la littérature scientifique. Notre travail s'appuie également sur une méta-analyse réalisée par nos soins concernant les traitements de référence par collyre de digluconate de chlorhexidine ou PHMB (polyhexaméthylène biguanide) à 0,02 % en monothérapie ou en association avec une diamine (propamidine ou hexamidine) à 0,1 %. La chlorhexidine est une molécule efficace pour le traitement de cette pathologie et s'avère être une alternative au PHMB. Il convient d'envisager la préparation d'un collyre de digluconate de chlorhexidine à la PUI dont la stabilité physico-chimique sera étudiée et l'efficacité *in vitro* comparée à celle d'un collyre de PHMB.

Mots-clefs : kératite amibienne, chlorhexidine, polyhexaméthylène biguanide

Abstract: *Acanthamoeba keratitis* is a rare but potentially blinding infectious disease. It is caused by a free-living amoeba, *Acanthamoeba spp.* This ubiquitous protozoan has the ability to take on a cystic form which allows it to resist unfavourable environmental conditions as well as numerous molecules. There is no licensed anti-amoebic ophthalmic formulation for this indication in France or in the world, which is why eye drops are generally prepared in hospital pharmacies. In view of the lack of clinical data and the risk of supply shortages for certain raw materials, we propose a synthesis of the various existing drug treatments, in relation to recent data from the scientific literature. Our work is also based on a meta-analysis carried out by us concerning the reference treatment with chlorhexidine digluconate eye drops or PHMB (polyhexanide) at 0.02 % as monotherapy or in combination with a diamine (propamidine or hexamidine) at 0.1 %. Chlorhexidine is an effective molecule for the treatment of this condition and seems to be an alternative to PHMB. The preparation of a chlorhexidine digluconate eye drop at the hospital pharmacy should be considered, its physico-chemical stability studied, and its efficacy compared with that of PHMB eye drop.

Key words: *Acanthamoeba keratitis*, chlorhexidine, polyhexanide