

Samenvatting en conclusies

SAMENVATTING

Uveïtis is een verzamelnaam voor alle inwendige ontstekingen van het oog en is een belangrijke oorzaak van slechtziendheid en blindheid. In Europa wordt in 20%-25% van de gevallen de uveïtis veroorzaakt door een infectie. In ongeveer 30% is het geassocieerd met een niet-infectieuze vaak onderliggende aandoening. Van de overige 50% is het (nog) onbekend wat de oorzaak is en het is mogelijk dat nog niet gediagnosticeerde infecties ook een rol spelen.

Een snelle identificatie van infectieuze uveïtis entiteiten is van groot belang, omdat de behandeling en visuele prognose totaal verschillend zijn van die van niet-infectieuze uveïtis. Bloedonderzoek alleen levert geen bewijs voor de oorzaak van de intra-oculaire infectie en het is daarom noodzakelijk om oogvocht te onderzoeken. Het doel van dit proefschrift is om nieuwe veroorzakers van infectieuze uveïtis te ontdekken door ontwikkeling en toepassing van nieuwe diagnostische testen op oogvochten en om meer inzicht te krijgen in de (immuun-) pathogenese van infectieuze uveïtis.

Hoofdstuk 1 geeft een introductie en een recent overzicht van wat tot nog toe bekend is in de literatuur over analyse van oogvochten en de oorzaken van infectieuze uveïtis. Oogvochtanalyse met behulp van PCR (aantonen van genetische informatie) en de detectie van intra-oculaire antilichaam productie door bepaling van de Goldmann-Witmer coëfficiënt (GWC) worden beschreven en bediscussieerd. Verder worden bekende infectieuze veroorzakers van uveïtis en de bijbehorende diagnostische bepalingen beschreven. Ook wordt aandacht besteed aan mogelijk nieuwe veroorzakers van infectieuze uveïtis, zoals rubellavirus, parvovirus B19, humaan parechovirus en humaan herpesvirus 6.

In **hoofdstuk 2** onderzochten wij of rubellavirus geassocieerd is met het Fuchs heterochrome uveïtis syndroom (FHUS) door bepaling van intra-oculaire antilichaam productie (GWC) tegen rubellavirus bij 14 patiënten met een klinisch beeld van FHUS, bij 13 controle patiënten met herpetische uveïtis anterior en bij 19 controle patiënten met oculaire toxoplasmose (OT). Actieve productie van antistoffen in het oog tegen rubellavirus werd gevonden in 13 van 14 (93%) patiënten. Deze patiënten waren negatief voor herpes simplex virus (HSV), varicella zoster virus (VZV) en *Toxoplasma gondii*. Geen enkele controle patiënt liet intra-

oculaire antilichaam productie tegen rubellavirus zien. Wij concludeerden dat rubellavirus, en niet HSV, VZV en *T. gondii*, geassocieerd is met FHUS.

In **hoofdstuk 3** onderzochten wij de klinische karakteristieken van 30 patiënten met chronische uveïtis anterior (UA) en een positieve oogvochtanalyse voor rubellavirus, en beoordeelden of er overeenkomsten zijn met FHUS. Wij hebben diverse klinische kenmerken van deze patiënten vergeleken met 13 patiënten met chronische UA waarvan de oorzaak onbekend is. Patiënten met rubellavirus-geassocieerde uveïtis bleken jonger bij het eerste bezoek aan de oogarts. Rubellavirus-positieve patiënten presenteerden zich vaker met unilaterale uveïtis, descemet stippen, iris atrofie en/of heterochromie, glasvochttroebelingen, en cataract. Ook kwam de combinatie van de vier hoofdsymptomen van FHUS (descemet stippen, afwezigheid van synechiae posteriores (verklevingen), cataract en glasvochttroebelingen) vaker voor in de rubellavirus-positieve groep. Wij concludeerden dat rubellavirus een klinisch spectrum van symptomen veroorzaakt dat vergelijkbaar is met het syndroom van FHUS, wat suggereert dat het virus betrokken is in de pathogenese van FHUS.

In de literatuur is vaak beschreven dat patiënten met FHUS (chorio)retinale laesies hebben, die lijken op Toxoplasmose littekens. In **hoofdstuk 4** onderzochten wij of de focale (chorio) retinale laesies bij patiënten met intra-oculaire rubellavirus infectie verschillen van de laesies bij patiënten met een intra-oculaire *T. gondii* infectie. Fundusfoto's en fluorescentie angiogrammen werden geanonimiseerd en gemaskeerd voor het veroorzakende pathogeen en geëvalueerd door vier experts op het gebied van OT. Er werden geen verschillen gevonden tussen de retinale laesies bij rubellavirus-positieve en rubellavirus-negatieve patiënten. In 55% van de rubellavirus-positieve patiënten en in 88% van de *T. gondii*-positieve patiënten vonden ten minste drie van de vier experts de retinale afwijkingen lijken op de laesies die gezien worden bij OT. Twee experts vonden de retinale laesies in *T. gondii*-positieve patiënten vaker "consistent met het beeld van oculaire toxoplasmose". Onze conclusie was dat de chorioretinale laesies bij patiënten met intra-oculaire rubellavirus infectie niet anders waren dan de laesies van patiënten met OT en dat de etiologische diagnose van deze laesies dus niet enkel op klinische gronden kan worden gemaakt. We vonden een hoge seroprevalentie

voor *T. gondii* in de rubellavirus-geassocieerde FHUS patiënten. Echter, patiënten met FHUS presenteerden zich nooit met actieve laesies en vertoonden nooit symptomen die passen bij het klinisch beeld van OT. Ook hebben wij een *T. gondii*-seronegatieve RV-FHUS patiënt gevonden, die chorioretinale littekens had. Meer onderzoek is nodig om op te helderen wat de oorzaak van deze laesies bij patiënten met FHUS is.

In **hoofdstuk 5** onderzochten wij of *Toxocara canis* een rol speelt bij uveïtis posterior waarvan de oorzaak onbekend is, door middel van GWC bepaling bij 37 volwassenen en 12 kinderen. Geen van de 37 volwassenen had een positieve GWC, terwijl drie van de twaalf kinderen wel intra-oculaire antilichaam productie tegen *Toxocara canis* vertoonden. Deze drie kinderen hadden lage of niet-gedetectedeerde serum titers, en de intra-oculaire antilichaam titers waren consequent hoger dan de titers in het perifere bloed. Eén kind had vitritis, een ander presenteerde zich met een laaggradige uveïtis en een perifere retinale laesie en het derde kind had uveïtis posterior en een chorioretinaal litteken. Oculaire toxocariasis komt blijkbaar voornamelijk bij kinderen voor. Onze bevindingen ondersteunen dat alleen serologische screening niet voldoende is voor de diagnose van oculaire toxocariasis en dat GWC analyse zeer waardevol kan zijn bij de diagnose van (jonge) patiënten met posterieure focale laesies of vitritis waarvan de oorzaak onbekend is.

In **hoofdstuk 6** beschreven wij een volwassen patiënt met een afname van de visus van het rechter oog. Bij oogheelkundig onderzoek had hij cellen en troebelingen in het glasvocht en een wit infiltraat in de achterste pool van de retina. Ondanks negatieve serologie had deze patiënt intra-oculaire antilichaam productie tegen *Toxocara canis*. Na behandeling met antihelminthica werd het infiltraat kleiner. Hoewel oculaire toxocariasis voornamelijk bij kinderen voorkomt (hoofdstuk 5), moet men erop bedacht zijn dat het ook volwassenen kan treffen. Het is belangrijk om het oogvocht te analyseren op antilichaam productie tegen *Toxocara canis*, ook wanneer *Toxocara* serologie negatief is, omdat een vroege diagnose en interventie de prognose verbeteren.

In **hoofdstuk 7** analyseerden wij 139 oogvocht materialen van patiënten die

verdacht zijn voor infectieuze uveïtis, voor een groot aantal pathogenen met behulp van PCR. Alle patiënten waren negatief in het oogvocht voor de meest voorkomende veroorzakers HSV, VZV, cytomegalovirus (CMV) en *T. gondii*. We vonden positieve PCR resultaten in zeven patiënten: één was positief voor Epstein-Barr virus (EBV), één voor rubellavirus, één voor humaan herpesvirus 6 en vier patiënten waren positief voor humaan parechovirus. De laatste observatie is met name interessant, omdat infecties met humaan parechovirus vooral tijdens de kinderjaren voorkomen, terwijl de vier patiënten in onze studie volwassenen waren. Eén patiënt was immuungecompromitteerd en werd verdacht van oculaire syfilis. De andere drie patiënten hadden allemaal UA met betrokkenheid van de cornea en cellen in de voorste oogkamer. Wij concludeerden dat humaan parechovirus een nieuwe veroorzaker van infectieuze uveïtis zou kunnen zijn.

Net als *T. gondii*, HSV en rubellavirus, is het mogelijk dat andere virale kinderziekten ook uveïtis kunnen induceren. Om deze hypothese te toetsen hebben wij parvovirus B19, mazelen- en bofvirus uitgekozen als de meest aannemelijke kandidaten en met behulp van GWC analyse bepaald of deze virussen geassocieerd zijn met UA (**hoofdstuk 8**) of met intermediaire uveïtis, neuroretinitis en niet door *T. gondii* veroorzaakte focale chorioretinitis (**hoofdstuk 9**). Ook onderzochten we of CMV een veroorzaker van UA zou kunnen zijn (**hoofdstuk 8**). We vonden twee patiënten met onverklaarde UA en positieve GWC's voor CMV, en één patiënt die positief was voor parvovirus B19. Intra-oculaire antilichaam productie tegen mazelen- en bofvirus werd niet gedetecteerd. Geen van de patiënten met intermediaire uveïtis of uveïtis posterior had een positieve GWC voor de onderzochte virussen. Deze resultaten suggereerden, dat CMV en Parvovirus B19 mogelijk geassocieerd zijn met UA. We stellen voor om in patiënten met onverklaarde UA het oogvocht ook te analyseren voor deze pathogenen. Er is geen bewijs gevonden dat parvovirus B19, mazelen- en bofvirus betrokken zijn in de pathogenese van intermediaire uveïtis, neuroretinitis en focale chorioretinitis.

Omdat uveïtis is een intra-oculair ontstekingsproces is, verwachtten wij dat oogvochten van uveïtis patiënten ontstekingsmediatoren, zoals cytokinen en chemokinen, bevatten. Om de cytokinen en chemokinen te identificeren die mogelijk een rol spelen in de immuunpathogenese van drie belangrijke typen

infectieuze uveïtis, hebben wij met behulp van een multiplex immunoassay, gelijktijdig afgenomen serum en oogvocht paren van 18 patiënten met rubellavirus-geassocieerde Fuchs Uveïtis Syndroom (RV-FHUS), van 20 patiënten met OT, en van 19 patiënten met acute retinale necrose (ARN) (**hoofdstuk 10**) geanalyseerd. De resultaten lieten bij RV-FHUS en OT een overeenkomstig patroon van cytokinen en chemokinen productie zien, dat duidelijk verschillend was van dat bij ARN. ARN patiënten produceerden meer ontstekingsmediatoren en tot hogere concentraties dan RV-FHUS en OT patiënten. IL-12 niveaus waren significant hoger in de RV-FHUS en OT patiënten vergeleken met de ARN en de controle patiënten. Aan de andere kant, waren IL-10 en IL-18 concentraties significant hoger in ARN vergeleken met RV-FHUS, OT en de controles. IFN γ was verhoogd in de ARN patiënten. In geen van de patiënten kon een correlatie worden gevonden tussen cytokinen productie en het interval tussen de aanvang van de symptomen en het afnemen van het oogvocht. Er kon ook geen correlatie worden gevonden tussen het gebruik van corticosteroïden en cytokine productie. Wij concludeerden dat de verschillen in cytokinen en chemokinen expressie tussen RV-FHUS en OT en ARN, mogelijk gerelateerd zijn met ziekteactiviteit en de ernst van het klinische ziektebeeld. Geen eenduidig T helper-pad kon worden aangetoond voor de uveïtis entiteiten. Zowel Th1 als Th2 cytokinen en chemokinen lijken een rol te spelen.

In **hoofdstuk 11** analyseerden wij serum en intra-oculaire vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in 17 patiënten met ARN en 16 patiënten met OT met behulp van een immunoassay, om te bepalen of de omvang en ernst van de retinale ontsteking gerelateerd is aan het intra-oculaire VEGF. Wij vonden dat intra-oculaire VEGF concentraties in patiënten met ARN hoger was dan in OT patiënten, terwijl de VEGF niveaus in de sera niet verschilden. Intra-oculaire VEGF concentraties overschreden die van serum in 47% van de patiënten met ARN vergeleken met 6% van de OT patiënten. Verder vonden we dat de patiënten met intra-oculaire VEGF niveaus hoger dan in het serum een uitgebreidere retinitis hadden en vaker een verminderde visus bij de drie maanden follow-up ($P < 0.001$ en $P = 0.031$, respectievelijk).

Wij concludeerden dat hoge intra-oculaire VEGF productie in patiënten met ARN geassocieerd is met uitgebreide retinitis en een slechte visuele prognose. Hoge lokale VEGF expressie in ARN zou een belangrijk gegeven kunnen zijn voor de toekomstige behandeling van de patiënten met ARN.

In **hoofdstuk 12** beschreven wij een pilot-studie waarin we specifieke eiwitprofielen willen genereren met behulp van Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (Seldi-tof) in de glasvochten van vijf patiënten met acute postoperatieve endophthalmitis. Drie van deze vijf patiënten hadden een positieve kweekuitslag voor staphylococcen en de andere twee patiënten een negatieve. Als controles includeerden wij drie glasvochten van patiënten met een maculagat, zonder ontsteking. Onze data lieten zien, dat de patiënten met endophthalmitis andere eiwitprofielen hebben dan de controles. Ook analyseerden wij met Seldi-tof analyse, gepaarde voorste oogkamervocht en serum samples van patiënten met intra-oculaire antilichaam productie tegen HSV (n=10) en *T. gondii* (n=8). Als controles includeerden wij patiënten met ouderdoms staar (n=7). Deze experimenten lieten een piek zien in het voorste oogkamervocht, die specifiek leek te zijn voor *T. gondii* en niet gevonden werd in sera. Deze data wijzen erop dat oogvochten geschikt zijn voor Seldi-tof analyse en dat deze techniek mogelijk gebruikt zou kunnen worden voor de detectie van specifieke intra-oculaire biomarkers. Verder onderzoek nodig is om de relevantie van onze observaties te bepalen.

CONCLUSIES

In dit proefschrift laten wij zien dat rubellavirus geassocieerd is met het Fuchs Heterochrome Uveïtis Syndroom (FHUS). De meerderheid van onze patiënten met het klinische beeld van FHUS hadden intra-oculaire antilichaam productie tegen rubellavirus. Daarnaast vertoonden de patiënten met rubellavirus-geassocieerde uveïtis een duidelijk klinisch spectrum van oculaire symptomen overeenkomend met de symptomen van patiënten met FHUS. Echter, omdat we ook de vier klassieke klinische criteria van FHUS (karakteristieke descemet stippen, diffuse iris atrofie en/of heterochromie, afwezigheid van synechiae posteriores en cataract) vonden in patiënten die geen intra-oculaire antilichaam productie tegen rubellavirus hadden, zouden er andere veroorzakers van FHUS kunnen bestaan. Zo is recent CMV geassocieerd met FHUS. Het is waarschijnlijk dat FHUS een klinisch syndroom is dat verschillende oorzaken kan hebben en mogelijk worden in de toekomst nog andere, met FHUS geassocieerde pathogenen geïdentificeerd. In het verleden zijn veel verschillende namen gebruikt om Fuchs Heterochrome Uveïtis Syndroom (FHUS) te beschrijven, waaronder Fuchs' heterochrome (irido) cyclitis, Fuchs' uveïtis anterior en Fuchs' heterochrome uveïtis. Dit verklaart de verschillende benamingen in de hoofdstukken van dit proefschrift. Onlangs is echter besloten door de International Uveitis Study Group om deze klinische aandoening 'Fuchs Heterochrome Uveïtis Syndroom' te noemen. Wanneer het wordt veroorzaakt door een geïdentificeerd pathogeen noemen we het bijvoorbeeld rubellavirus-geassocieerd Fuchs Heterochrome Uveïtis Syndroom of CMV-geassocieerd Fuchs Heterochrome Uveïtis Syndroom.

De aanwezigheid van toxoplasmose-achtige chorioretinale laesies in patiënten met rubellavirus-geassocieerde Fuchs uveïtis syndroom (RV-FHUS) is opvallend. Onze studie liet duidelijk zien dat de diagnose niet gemaakt kan worden enkel op klinische gronden en dat oogvocht analyse nodig is om de definitieve diagnose te stellen. De vraag blijft welk pathogeen deze chorioretinale littekens veroorzaakt in patiënten met RV-FHUS.

In dit proefschrift onderzochten wij de oogvochten van patiënten met uveïtis waarvan de oorzaak onbekend is, met behulp van een PCR voor een groot aantal pathogenen. Een andere groep patiënten werd geanalyseerd met behulp

van GWC voor CMV en voor virussen die vaakvoorkomende virale kinderziekten veroorzaken, zoals parvovirus B19, mazelen- en bofvirus. Wij vonden positieve resultaten voor humaan parechovirus, humaan herpesvirus 6, parvovirus B19 en CMV en concludeerden dat deze virussen mogelijk geassocieerd zijn met infectieuze uveïtis. Verder onderzoek naar de rol van humaan parechovirus en humaan herpesvirus 6 zal moeten worden uitgevoerd om te bepalen of deze virussen echte veroorzakers zijn van infectieuze uveïtis. Daarnaast kunnen we, gezien het lage aantal patiënten dat getest is, voor parvovirus B19, mazelen- en bofvirus niet bewijzen dat deze virussen al dan niet betrokken zijn bij de pathogenese van uveïtis. Het zou interessant zijn om grote aantallen patiënten met uveïtis van onbekende oorzaak te analyseren voor deze virussen en ook PCR bepalingen toe te passen in deze studies.

Onze studies lieten zien dat GWC analyse voor oculaire toxocariasis waardevol is bij het diagnosticeren van patiënten met posterieure focale laesies of vitritis waarvan de oorzaak onbekend is, voornamelijk bij kinderen. Echter, het moet benadrukt worden dat oculaire toxocariasis ook kan voorkomen bij volwassenen. Het is bovendien belangrijk te realiseren dat oogvocht analyse essentieel is voor de diagnose, omdat serologische screening voor *Toxocara canis* niet informatief is en serologie vals-negatief kan zijn. In toekomstige studies zou het interessant zijn om de rol van andere nematodes, zoals *Ascaris lumbricoides*, in infectieuze uveïtis te onderzoeken.

In een uitvoerige studie naar de rol van ontstekingsmediatoren in infectieuze uveïtis, zagen wij dat de oogvochten van patiënten met RV-FHUS en OT een overeenkomstig patroon van cytokine en chemokine productie laten zien, anders dan dat van ARN. Oogvochten van patiënten met ARN toonden hogere productie van cytokinen en chemokinen, wat mogelijk correleert met een hogere activiteit van de ziekte en een ernstiger ziektebeeld. Een overduidelijk Th1- of Th2-geassocieerd profiel kon niet worden aangetoond. Daarnaast lijken VEGF levels, welke een cruciale rol spelen in de intra-oculaire ischemische processen en de daaropvolgende ontwikkeling van neovascularisaties, significant hoger te zijn in de oogvochten van patiënten met ARN in vergelijking met OT. Analyse van een groter aantal patiënten in vergelijking met een niet-infectieuze uveïtis, liefst in

een homogene controle groep, zou mogelijk meer inzicht kunnen geven in de immuunpathogenese van ARN, RV-FHUS en OT. Ook zou het waardevol zijn om te bepalen of anti-VEGF behandeling een bijdrage zou kunnen leveren aan een betere prognose van ARN.

De bevindingen beschreven in dit proefschrift zijn waardevol voor de snelle diagnostiek van infectieuze uveïtis en hebben het spectrum van veroorzakende pathogenen betrokken bij infectieuze uveïtis uitgebreid. Analyse van oogvochten, met in het bijzonder de combinatie van detectie van intra-oculaire antilichaam productie en PCR, is waardevol in de diagnose van patiënten met infectieuze uveïtis. Hiermee kan snel onderscheid gemaakt worden tussen een infectieuze en niet-infectieuze oorzaak, wat belangrijke consequenties kan hebben voor de behandeling en de prognose van de patiënt. De beschreven uitbreiding van het diagnostische repertoire en de nieuwe inzichten in de (immuun-)pathogenese vergroten onze kennis op het gebied van infectieuze uveïtis, een aandoening die blindheid kan veroorzaken en -indien de diagnose bekend is- vaak behandelbaar is.

