

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

---

Dipartimento di Medicina Molecolare

Corso di Laurea in Ottica e Optometria



Tesi di Laurea:  
Nuovi materiali per portamenti sanitizzanti:  
l'argento ( $Ag^+$ )

Relatore :  
Prof. Gianumberto  
CARAVELLO

Correlatore:  
Dott. Irene AMORUSO

Tesi di laurea di:  
Barbara DE BORTOLI  
Matricola N° 1022283

---

Sessione di Settembre  
Anno Accademico 2013 - 2014



# Indice

0.1	RIASSUNTO . . . . .	5
<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
1.1	I depositi sulle LaC e il biofilm . . . . .	11
1.2	Interazioni batteriche con le lenti a contatto: l'effetto del materiale . . . . .	14
1.3	Complicazioni corneali indotte da lenti a contatto . . . . .	15
1.3.1	Microbial Keratitis (MK) . . . . .	16
1.3.2	Contact Lens Acute Red Eye (CLARE) . . . . .	21
1.3.3	Contact Lens Peripheral Ulcer (CLPU) . . . . .	23
1.3.4	Infiltrative Keratitis (IK) . . . . .	25
1.3.5	Asymptomatic Infiltrative Keratitis (AIK) . . . . .	27
1.4	Prodotti e strumenti per la cura delle LaC . . . . .	28
1.4.1	Disinfezione termica [1] . . . . .	28
1.4.2	Disinfezione con raggi ultravioletti [1] . . . . .	29
1.4.3	I mezzi chimici di manutenzione [1] . . . . .	29
1.5	Il problema del portamenti e della compliance . . . . .	34
1.6	L'argento in contattologia . . . . .	35
1.7	Scopo della tesi . . . . .	36
<b>2</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>39</b>
2.1	Materiali plastici testati . . . . .	39
2.2	Ceppi batterici utilizzati . . . . .	39
2.3	Reagenti, mezzi di coltura e soluzioni. . . . .	40
2.4	Strumenti e consumabili . . . . .	41
2.5	Protocollo analitico . . . . .	42
2.5.1	Preparazione della sospensione batterica . . . . .	42
2.5.2	Inoculo dei campioni . . . . .	43
2.5.3	Semina delle piastre di coltura . . . . .	43
2.5.4	Lettura delle piastre e analisi dati . . . . .	44
2.5.5	Condizioni di validità del test . . . . .	45
2.5.6	Determinazione dell'attività antibatterica . . . . .	46

<b>3</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>47</b>
3.1	E. coli – prima prova . . . . .	47
3.2	S. aureus – prima prova . . . . .	49
3.3	E. coli – Seconda prova . . . . .	51
3.4	S. aureus – seconda prova . . . . .	55
<b>4</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>61</b>

## 0.1 RIASSUNTO

Ci sono circa 125 milioni di portatori di lenti a contatto (LaC) al mondo e annualmente nuovi materiali vengono lanciati sul mercato per rispettare la corretta fisiologia corneale. Sebbene si parli più spesso di comfort e ossigenazione c'è bisogno anche di assicurare un porto della lente sicuro, quindi proteggere l'occhio dagli agenti patogeni che, attecchendo alla lente, potrebbero innescare infezioni dagli esiti anche gravi. Attualmente, per scongiurare tali eventi negativi, viene raccomandata un'attenta igiene personale unita a un corretto regime di manutenzione delle LaC, il quale viene attuato principalmente tramite l'utilizzo di detergenti, disinfettanti e conservanti che ultimamente sono stati riuniti in un'unica soluzione: si tratta delle multi purpose solutions (MPSs). Sembra che anche il portamenti abbia un ruolo importante nella contaminazione delle LaC quindi si è cercato di agire su questo fattore di rischio incorporando nel polimero plastico di cui sono composti degli ioni di argento ( $\text{Ag}^+$ ), un materiale noto in ambito sanitario per le sue proprietà antibatteriche. In questo lavoro di tesi si sono volute condurre delle prove pilota per la valutazione dell'attività antibatterica di due portamenti, attualmente in commercio, con ioni argento addizionati al polimero. Come linea guida per la conduzione delle prove è stata principalmente usata l'ISO 22196:2011(E), "*Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*". I risultati ottenuti con questa metodologia non hanno evidenziato un'attività antibatterica rilevante, nonostante ciò si incoraggia l'esecuzione di ulteriori ricerche volte al perfezionamento dell'impiego dell'argento in campo contattologico, soprattutto considerando gli indiscussi benefici che il suo utilizzo ha già addotto in ambito medico-sanitario. La ricerca dovrebbe pertanto concentrarsi sull'individuazione della concentrazione di ioni argento ottimale per il raggiungimento di livelli di attività antibatterica in grado di soddisfare i requisiti normativi, o quantomeno avvicinarvisi in modo da poter impiegare i portamenti come coadiuvanti dell'attività delle MPSs, le quali potrebbero essere rese meno aggressive e quindi meno soggette ad essere fonte di reazioni allergiche e/o tossiche per gli occhi dei portatori.



# Capitolo 1

## INTRODUZIONE

Anche se le prime intuizioni riguardanti le lenti a contatto vengono fatte risalire addirittura a Leonardo Da Vinci per dei disegni fatti nel 1508, la data ufficiale che segna l'inizio della contattologia è il 1888, anno in cui il fisiologo Adolf Eugene Fick a Zurigo e l'oftalmologo Eugene Kalt a Parigi presentano due differenti applicazioni negli occhi di gusci di vetro, ossia i primi prototipi di lenti sclerari [1].

Il crescente interesse per la contattologia vede nel 1912 l'introduzione dei primi set di lenti di prova della Zeiss e delle alternative della ditta Müller, le quali risultavano più confortevoli perchè costruite per soffiatura[1].

Nel 1937 si iniziò ad utilizzare per la costruzione delle lenti a contatto il polimetilmetacrilato (pMMA), un polimero termoplastico conosciuto con il nome commerciale di plexiglas, che sebbene avesse ottime proprietà ottiche e fosse anallergico comportava però risposte anomale della cornea specialmente nelle applicazioni a lungo termine [1].

La comprensione che il ricambio lacrimale al di sotto della lente a contatto giocasse un ruolo importante per il successo dell'applicazione portò nel 1950 al brevetto della prima lente corneale sferica ad opera di Kevin Tuohy, un ottico del New Jersey [1].

Tuttavia il rispetto della fisiologia corneale rimaneva un ambito di ricerca in cui sia ricercatori che contattologi clinici non smettevano: nello specifico si concentrarono sullo sviluppo di nuovi materiali che permettessero un apporto di ossigeno atmosferico ideale per il fabbisogno corneale. Fu così che a Praga nel 1960 Wichterle e Lim sintetizzarono un nuovo polimero, il poli(2-idrossietilmetacrilato) (pHEMA) [1], una formulazione idrogel.

Se il pMMA non rispettava la fisiologia corneale, l'idrogel di pHEMA presentava ancora dei limiti ottici. La sfida nella ricerca di un materiale capace di eapparentare un valido compromesso tra i due vide nel 1973 la comparsa delle lenti in acetato butirrato di cellulosa (CAB), dure ma allo stesso tempo gas permeabili [1].

I più recenti tentativi di minimizzare i segni di ipossia hanno portato al lancio sul mercato di lenti in silicone idrogel (SiHy), uno degli ultimi tipi di materiali sviluppati.

Inoltre, per venire in contro alle esigenze dei sempre più numerosi fruitori, la ricerca ha portato ad avere nel 2010 in America 90 diversi materiali per lenti morbide e 66 per le lenti rigide [2].

I più innovativi materiali per lenti morbide incorporano agenti reticolanti (crosslinkers), stabilizzanti, gradienti di contenuto idrico e pigmenti per incrementare la permeabilità all'ossigeno e la morbidezza, garantendo così livelli di comfort ottimali [2].

Di pari passo all'aumento dei portatori di lenti a contatto si sono verificate anche le prime complicazioni causate da batteri che in qualche modo riescono a colonizzare la superficie della lente e ad eludere in seguito le difese oculari. Il processo d'infezione può essere schematizzato in quattro fasi [3] Figura 1.1 :

1. Il batterio riesce a sopravvivere nel fluido lacrimale, nonostante sia costituito anche da proteine battericide come lisozima,  $\beta$ -lisina, lattoferrina, lipocalina e immunoglobuline A secretoria [4] [5]. Il batterio aderisce poi alla superficie oculare, benchè fronteggi la presenza di difese meccaniche e chimiche, quali l'ammiccamento ed il costante ricambio lacrimale.
2. In seguito all'adesione a questa prima barriera fisiologica, il batterio penetra lo strato mucoso che ricopre l'epitelio corneale. Anche qui il batterio deve eludere la difesa fornita dal glicocalice, un rivestimento epiteliale composto da glicoproteine transmembrana, che di norma è in grado di intrappolare i corpi estranei. Con l'ammiccamento questa guaina si sfalda e grazie ai movimenti oculari il residuo catturato viene sospinto verso il canto interno dell'occhio ed espulso grazie alla lacrimazione [4]. Recenti studi hanno dimostrato che la perdita della mucina MUC16, una delle glicoproteine di membrana delle cellule epiteliali della mucosa oculare, può servire come marker di una compromissione della superficie oculare [6].
3. L'ultima barriera fisica che si oppone all'ingresso del patogeno nella cornea è rappresentata dalla membrana basale dell'epitelio corneale, la quale funge da filtro meccanico in quanto i suoi pori hanno un diametro mediamente minore alle dimensioni dei batteri. Anche la membrana di Bowman, ancorata alla membrana basale mediante fibrille di collagene VII, partecipa nell'aumentare il livello di resistenza alle infezioni [4].

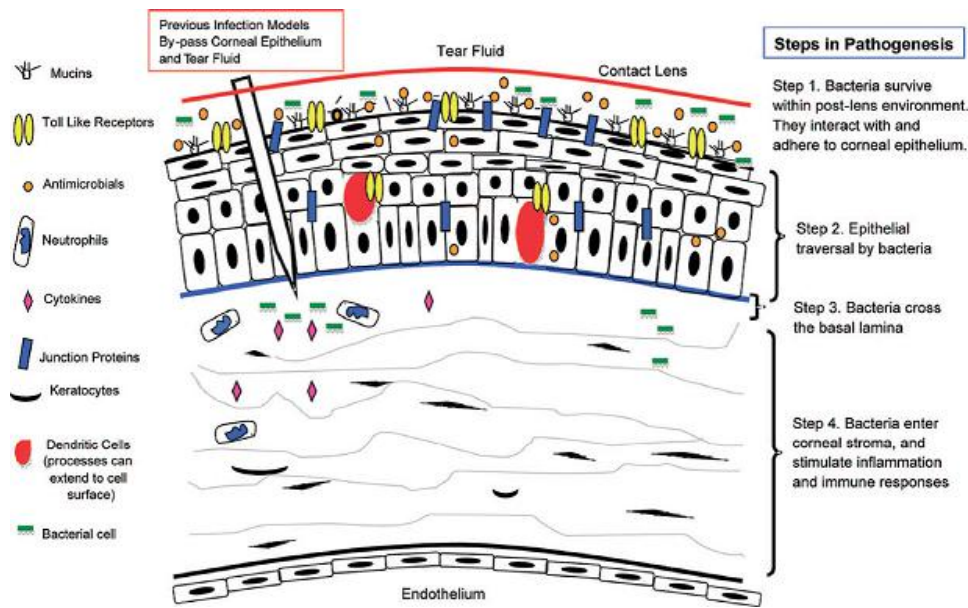


Figura 1.1: Processo schematico della patogenesi della cheratite da *P. aeruginosa*. Immagine tratta da Fleiszig SM, Evans DJ. Pathogenesis of contact lens-associated microbial keratitis. *Optometry and Vision Science* 2010, 4, 87, 225-232.

4. Qualora il batterio riuscisse a superare tutti i precedenti sistemi di difesa, esso penetra nello stroma corneale, dove stimola l'attivazione dell'immunità innata o aspecifica e, contestualmente, l'innescò di un processo infiammatorio.

Con l'applicazione della lente a contatto i vari step di difesa vengono più facilmente compromessi. I principali fattori causali sono:

- *Traumi*: reazioni allergiche o tossiche, abrasioni meccaniche causate da corpi estranei al di sotto della lente possono favorire l'adesione e la penetrazione batterica con il conseguente innescò di un'infezione.
- *Edema corneale*: questa reazione è associata all'ipossia, ossia all'insufficiente apporto di ossigeno alla cornea che causa un eccessivo ingresso di liquidi in essa. L'edema può causare fragilità epiteliale e quindi facilitare l'insorgenza di infezioni [6].

- *Aumento del tempo di ritenzione batterica:* il tempo richiesto perchè una tintura vitale penetri al di sotto di una lente a contatto morbida è di 10-15 minuti rispetto ai 5 secondi necessari per una RGP. Ciò significa che il fluido lacrimale ristagna più a lungo sotto una lente morbida e questo può promuovere la sopravvivenza di eventuali agenti patogeni sospesi in esso, aumentarne l'infettività e la virulenza [3].
- *Inibizione delle difese epiteliali:* dopo 72 ore di porto continuo della lente, le difese dell'epitelio mucosale calano drasticamente a causa del limitato apporto di fluido lacrimale alle cellule [3].

Gli ultimi due punti fanno intuire come mai *l'extended wear* (EW), ossia un porto che prevede l'utilizzo della lente anche durante uno o più cicli di sonno prima di pulizia e disinfezione, sia più rischioso rispetto al *daily wear* (DW), il porto della lente soltanto durante il giorno. [3] L'alternativa migliore sarebbe pertanto l'uso di lenti *daily disposable* (DD), che riducono di 12 volte il rischio di complicanze corneali. [3]

Sono stati individuati inoltre alcuni fattori di rischio modificabili:

- *Il materiale della lente:* le lenti in SiHy aumentano il rischio di fenomeni infiammatori ma la durata e la gravità di questi sono inferiori rispetto agli eventi riscontrati durante l'EW con lenti Idrogel [3].
- *L'igiene del portamenti:* la contaminazione del portamenti avviene nell'85% dei casi di portatori asintomatici. Le specie di batteri rinvenuti nel biofilm sono *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* e *Delftia* [3].
- *Il prodotto per la manutenzione delle lenti:* le lenti a contatto disinfettate con sistemi al perossido causano meno eventi avversi rispetto alle *Multi Purpose Solutions* (MPSs). [3] Inoltre alcune MPSs possono alterare la funzione di barriera dell'epitelio, causare l'aumento della perdita di MUC16 e rendere così l'occhio più suscettibile alle infezioni microbiche [6].
- *La compliance del portatore:* diversi studi hanno dimostrato che la non-compliance dei portatori è associata all'aumento dei sintomi oculari lamentati. [3] Un sondaggio cieco in rete a cui hanno partecipato 633 soggetti divisi in 4 gruppi secondo le fasce di età (18-24, 25-29, 30-34 e 35-39 anni) ha evidenziato che i meno complianti sono i portatori più giovani (18-24 anni), i quali tendono ad occuparsi dell'igiene

delle proprie lenti soltanto quando iniziano ad avvertire i primi segni di irritazione oculare. Inoltre in nessuno gruppo la totalità dei soggetti rispetta lo step del lavaggio mani prima di maneggiare la lente [3]. In uno studio che confronta i tipi di batteri presenti sulle mani degli infermieri di alcuni centri neonatali di New York e comuni abitanti di Washington Heights è emerso che *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, due fra i maggiori agenti eziologici delle infezioni oculari derivanti da lenti a contatto, sono fra le specie più comunemente rilevate sulle mani dei cittadini [7].

Indubbiamente la procedura più cruciale per ridurre il rischio di reazioni avverse rimane la pulizia e la disinfezione delle lenti a contatto, attuabile tramite l'ausilio di mezzi fisici e chimici in continuo miglioramento. Tuttavia in questo lavoro di tesi si andrà a valutare il possibile ruolo coadiuvante, in tali procedure, di portalenti a cui siano state addizionate sostanze con attività microbica, nel nostro caso l'argento.

Per comprendere l'importanza di una corretta igiene delle lenti a contatto verranno in seguito trattati i fattori che favoriscono l'adesione batterica alla lente.

## 1.1 I depositi sulle LaC e il biofilm

Le lenti a contatto accumulano sulla loro superficie proteine provenienti dal film lacrimale che possono denaturare e perdere così la loro attività antimicrobica [5], oltre che causare reazioni allergiche [8]. Insieme alle proteine vengono adsorbiti dal materiale della lente anche lipidi e glicoproteine, nel loro insieme conosciuti come *depositi*, in quantità e qualità differenti a seconda della composizione chimica del materiale [9]. In contattologia i depositi non sono importanti solamente come fattori che influenzano la visione e il mantenimento del comfort della lente, ma soprattutto perchè i batteri aderiscono preferenzialmente a questi componenti piuttosto che al polimero della lente[9]. Se la lente non viene correttamente disinfettata, il conglomerato di depositi e batteri può fungere da innesco per una tenace pellicola biologica, *il biofilm*.

La formazione del biofilm inizia con la presenza di batteri in forma planc-tonica, ossia sospesi in un fluido a contatto con una determinata superficie solida, che nel caso in esame è rappresentata dalla lente. I batteri in questa forma sono vulnerabili all'azione di antibiotici, anticorpi e fagociti, ma alcuni di essi riescono ad arrivare a contatto con la superficie grazie al movimento dei loro flagelli, ossia appendici cellulari lunghe e sottili con funzione motoria, e ad aderirvi per formazione di legami deboli tramite pili o fim-

bric, appendici proteiche filamentose che si trovano sulla superficie di alcuni batteri. La comunità che si andrà a formare sarà poi circondata da una matrice secreta dalle stesse cellule colonizzatrici e formata in prevalenza da *esopolisaccaridi* (EPS) neutri o polianionici, come nel caso dei batteri Gram-negativi, proteine e DNA extracellulare. La natura di questa matrice polimerica dipende sia da fattori estrinseci, come le proprietà chimico-fisiche dell'ambiente dove il biofilm è localizzato, sia da fattori intrinseci, come la specie ed il genotipo delle cellule che lo compongono. Il biofilm può essere infatti composto da singole o multiple specie batteriche che andranno a costruire una complessa architettura tridimensionale dove i diversi colonizzatori sono strutturati e coordinati in comunità funzionali capaci di cooperare nei processi metabolico-riproduttivi o infettivi. Spesso queste macrocolonie sono separate fra loro da canali pieni di liquido che facilitano l'apporto di nutrienti e l'estruzione dei cataboliti[10]. La maturazione del biofilm è regolata dal *quorum sensing*, ossia un meccanismo densità dipendente che regola alcuni processi, fra i quali la virulenza contro l'ospite, in base al numero di interazioni che un batterio ha con altri suoi simili [10].

Di particolare interesse clinico è l'incremento di resistenza agli agenti antimicrobici nonché ai mediatori della risposta immunitaria che le cellule del biofilm guadagnano rispetto a quelle in forma planctonica. I meccanismi responsabili di tale resistenza sono molteplici[11]:

- penetrazione ritardata dell'agente antimicrobico attraverso la matrice del biofilm;
- tasso di accrescimento alterato degli organismi all'interno del biofilm;
- cambiamenti fisiologici dovuti al modo di sviluppo del biofilm;

Studi più recenti hanno suggerito che più probabilmente la resistenza è dovuta a strategie multicellulari e/o alla capacità delle singole cellule, interne al biofilm, di differenziarsi in uno stato fenotipico tollerante all'azione antibiotica[12]. Uno studio sull'esposizione di un biofilm di *Klebsiella pneumoniae* all'antibiotico *ciprofloxacina* ha infatti evidenziato una suscettibilità differenziale tra cellule periferiche, più sensibili, e cellule "centrali", nonostante fosse stato dimostrato il passaggio dell'agente attraverso l'intero biofilm[10]. Questo dato suggerisce che non tutte le cellule del biofilm aumentano la propria resistenza all'antibiotico, ma bensì che delle sottopopolazioni colonizzatrici possano subire delle specifiche alterazioni metaboliche[10].

La formazione del biofilm su protesi è un problema di grande interesse medico, in quanto questo rappresenta un accumulo di batteri che possono disperdersi nel corpo causando infezioni croniche o ricorrenti. L'inefficace

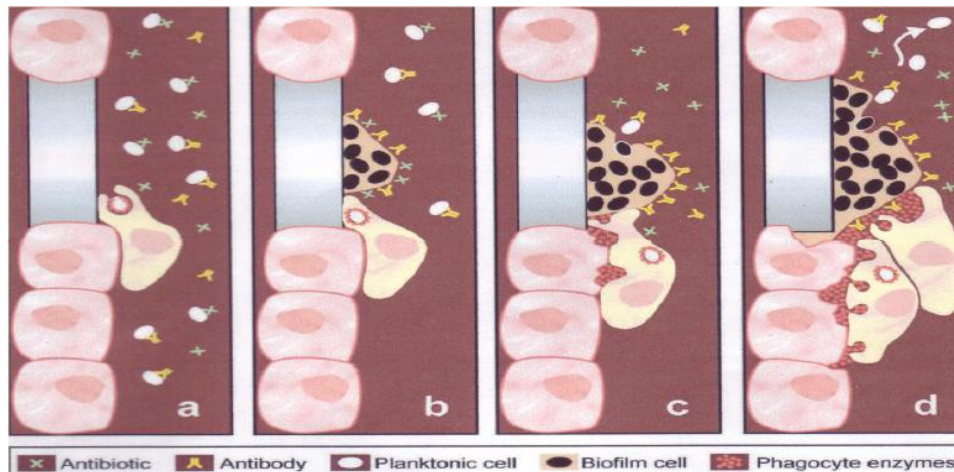


Figura 1.2: Rappresentazione schematica della formazione del biofilm su un dispositivo medico. **A)** Le cellule planctoniche sono suscettibili all'azione di antibiotici, anticorpi e fagociti. **B)** I batteri formano il biofilm preferenzialmente su una superficie inerte, la comunità diventa resistente all'azione di anticorpi, antibiotici e fagociti. **C)** I fagociti sono attratti dal biofilm. La fagocitosi è impedita ma vengono rilasciati enzimi proteolitici. **D)** Gli enzimi proteolitici danneggiano il tessuto circostante il biofilm. Batteri in forma planctonica lasciano il biofilm e possono causare infezioni acute nei tessuti circostanti. Immagine presa da *Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999 May 21;284(5418):1318-22.*

attacco del biofilm da parte del sistema immunitario dell'ospite può inoltre portare al danneggiamento dei tessuti circostanti a causa del rilascio di alte concentrazioni di enzimi proteolitici[10] Figura 1.2 .

Le lenti a contatto sono dispositivi medici di seconda classe che entrano in contatto con l'occhio e, come detto in precedenza, non sono esenti dalla formazione del biofilm sulla loro superficie. La comunità microbica può persistere a lungo, rilasciando periodicamente batteri in forma planctonica. Questi possono causare infezioni opportunistiche quando le condizioni sono più favorevoli[10]. Le endotossine rilasciate dal biofilm possono anche giocare un importante ruolo nel danneggiamento dell'epitelio corneale rendendo la cornea più predisposta allo sviluppo di infezioni[10].

## 1.2 Interazioni batteriche con le lenti a contatto: l'effetto del materiale

Precedentemente è stato detto che il tipo di materiale con cui è costruita una lente influisce sulla quantità e il tipo di deposito che si andrà ad accumulare e, dunque, sul tipo di batteri che vi potrebbe attecchire. Come regola generale possiamo dire che più cariche elettriche negative sono presenti sulla superficie della lente maggiore sarà l'adsorbimento di proteine cariche positivamente come il lisozima [1], la quale, pur essendo una proteina con attività antimicrobiche, rischia di denaturare e perdere le sue capacità divenendo così un papabile substrato per batteri.

Le lenti RGP che tendono ad accumulare una maggior quantità di depositi sono quelle con polimeri di *silossano-metacrilato* con l'aggiunta di monomeri di *acido metacrilico*, mentre quelle costruite con polimeri a base di fluoro risultano meno reattive. Per quanto riguarda invece le lenti morbide sono quelle ioniche e a bassa idrofilia ad accumulare la maggior quantità di residui proteici, sebbene ritengano meno lipidi rispetto a quelle contenenti *N-vinil pirrolidone*[9]. Le lenti al SiHy rappresentano al momento una categoria di lenti morbide a se stante: pare alcuni studi suggeriscono che aumentando la percentuale di silicone nel polimero aumenti anche l'affinità del materiale ai depositi.

Tra i nuovi materiali biocompatibili che sono stati formulati per cercare di minimizzare le complicazioni derivanti dall'inserzione nell'occhio di un corpo estraneo, di particolare rilievo risultano i polimeri contenenti *fosforicolina*, un componente dei fosfolipidi delle membrane cellulari. Tali materiali dovrebbero aiutare la fisiologia oculare ed evitare l'attecchimento di determinati componenti del film lacrimale, essere risultando nel complesso meno suscettibili alla formazione di depositi e quindi anche all'attecchimento dei microrganismi [13].

Alcuni studi hanno mostrato come il batterio Gram negativo *Pseudomonas aeruginosa* aderisca meglio alle lenti in SiHy rispetto a quelle in HEMA e ancor più a quelle con ridotta idrofobicità. Analoghi dati sono stati ottenuti anche per lo *Staphylococcus aureus* [3]. Nello studio condotto da *Willcox et al.*[9] viene messa in luce una differenza statisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) fra l'adesione batterica alle lenti *in vivo* rispetto a quella *in vitro*: ciò potrebbe essere considerato un ulteriore prova dell'importanza del substrato di depositi che si viene a formare sulle lenti quando vengono indossate. Le analisi statistiche dimostrano un significativo aumento nell'adesione di:

- *Pseudomonas aeruginosa* Paer1, *Haemophilus influenzae* 001 e *Stenotrophomonas maltophilia* 010 alle lenti *Balafilcon A* indossate;
- *Aeromonas hydrophilia* 003 alle lenti *Etafilcon A* indossate;

*Stenotrophomonas maltophilia* 010 invece ha diminuito la sua adesione sulle lenti *Etafilcon A* indossate ( $P < 0,025$ ).

Il quadro complessivo fa emergere come la mancata rimozione di microrganismi potenzialmente patogeni dalle lenti a contatto può portare non solo ad un porto non confortevole, ma anche all'insorgenza di infezioni rilevanti. Queste ultime verranno ora descritte più approfonditamente nel paragrafo successivo.

### 1.3 Complicazioni corneali indotte da lenti a contatto

In assenza di lenti a contatto il normale microbiota oculare è composto quasi esclusivamente da tre specie di batteri Gram positivi:

- *Stafilococchi coagulasi negativi*;
- *Corynebacterium sp.* ;
- *Propionibacterium sp.* ;

La microflora che colonizza le palpebre è invece pressochè uguale a quella dell'epidermide e contiene un numero maggiore di differenti specie batteriche rispetto alla congiuntiva[9].

Durante il porto giornaliero della lente è stato riportato un aumento del numero di batteri isolati dalla congiuntiva e dalle palpebre, ma il loro tipo non differiva da quello dei non-portatori. Un aumento dei batteri Gram negativi per contro è stato notato durante l'EW e ciò è particolarmente significativo in quanto questi microrganismi sono tra i più comuni patogeni oculari[9].

Le complicazioni corneali indotte dall'uso di lenti a contatto sono state recentemente classificate secondo la loro gravità[9]:

- *Risposta avversa severa.* - Cheratite microbica (MK), incidenza 0,3%;
- *Risposta avversa significativa.* -Occhio rosso indotto da lenti a contatto (CLARE), incidenza 1,4-6,2%; - Ulcera periferica indotta da lenti a contatto (CLPU), incidenza 0,6-8,7%; - Cheratite infiltrativa (IK), incidenza 1,7-5,2%;
- *Risposta avversa non significativa.* -Cheratite infiltrativa asintomatica (AIK), incidenza 1,5-3,9%; - Infiltrati asintomatici (AI), incidenza 5,2%;

Fra quelle elencate la colonizzazione batterica della LaC è il fattore iniziale di MK, CLARE, CLPU e, a volte, anche di IK e AIK [9].

### 1.3.1 Microbial Keratitis (MK)

Col termine *cheratite* si intende qualsiasi condizione infiammatoria della cornea e la sua presenza è tipicamente indicata da un'opacità dovuta ad edema e infiltrazione leucocitaria, oltre che dalla congestione dei vasi perilimbari[14].

Se il principio dell'infiammazione è superficiale si avrà un lieve danneggiamento dell'epitelio, ma l'approfondirsi della lesione porta alla formazione di un'ulcera corneale che provoca una lacrimazione riflessa, ossia la secrezione di un maggior volume di lacrime in risposta a uno stimolo. Nelle forme batteriche quest'ultima si trasforma in una secrezione mucopurulenta[14].

La forma più seria di cheratite è la *cheratite microbica*[15], un'infezione della cornea che può essere sostenuta da batteri, funghi o protozoi, come nel caso della famigerata *Acanthamoeba keratitis*[16]. L'incidenza di tale condizione varia in base al tipo di LaC utilizzata e al tipo di porto prescritto [2] Figura 1.3 .

I fattori di rischio generici per la contrazione di MK sono [8]:

- *EW*
- *Ipossia*
- *Scarsa compliance e igiene*
- *nuoto/doccia con LaC*
- *contatto con l'acqua*
- *trauma oculare*
- *diabete*
- *climi caldi*
- *classe socio-economic*
- *lunghi periodi di porto*

Vediamo ora in dettaglio le tre principali tipologie di MK.

1.3. COMPLICAZIONI CORNEALI INDOTTE DA LENTI A CONTATTO 17

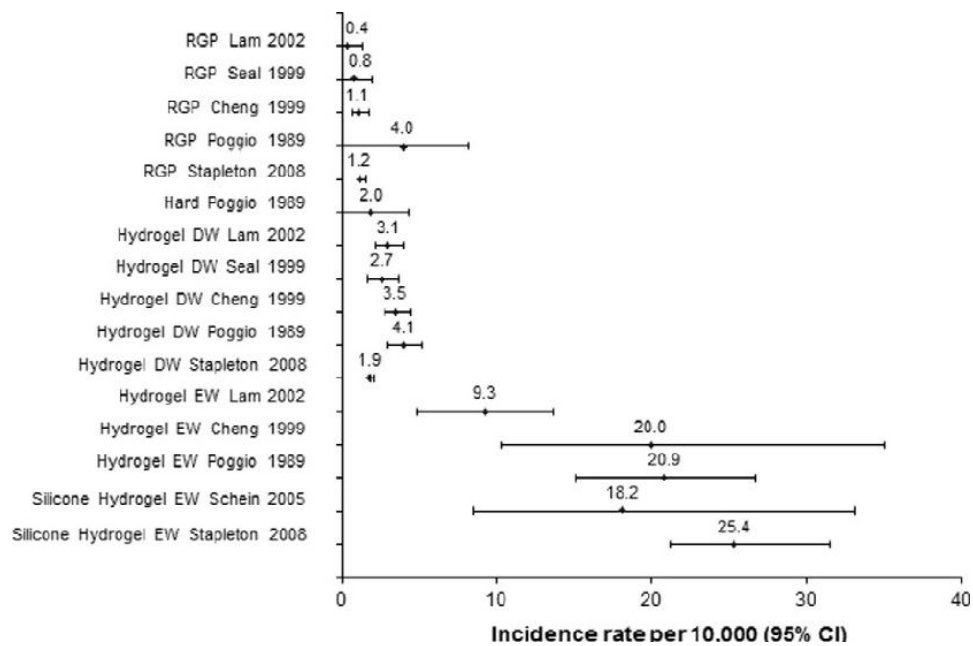


Figura 1.3: Stime dell'incidenza annua di MK su 10.000 portatori tratte da diversi studi prospettici. Immagine tratta da: *Wolters Kluwer Health, Keay L, Stapleton F, Schein O. Epidemiology of contact lens-related inflammation and microbial keratitis: a 20-year Eye & Contact Lens 2007;33(6 Pt 2):346-53; discussion: 362-3.*

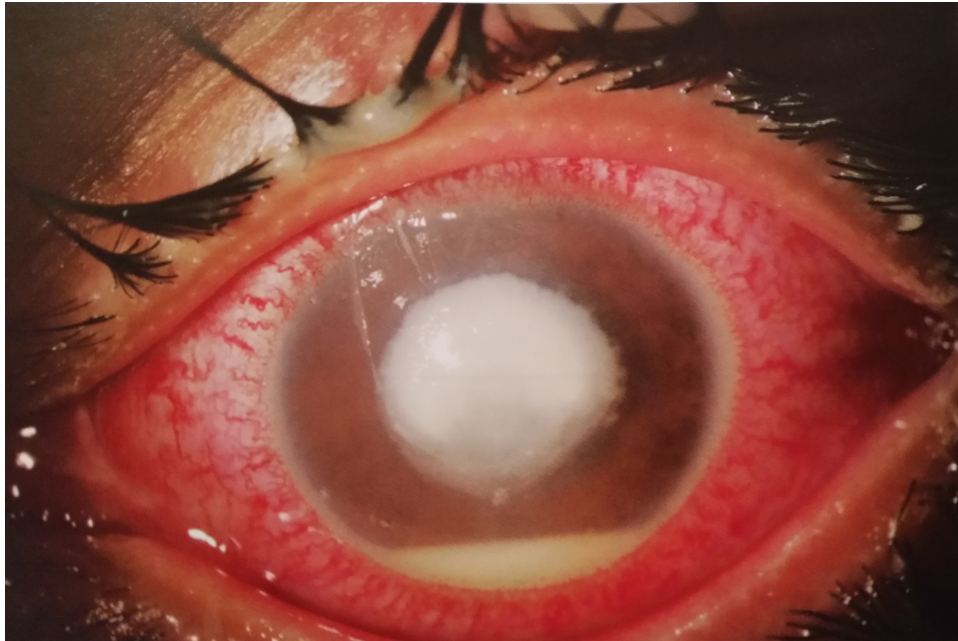


Figura 1.4: Questo è l'occhio di un ragazzo di 14 anni con un'ulcera causata da *Pseudomonas sp.*. La reazione in camera anteriore è abbastanza grave da aver causato ipopion. Immagine tratta da: *J. H. Krachmer, D. A. Palay. Cornea Atlas. Elsevier. Third edition. 2014.*

### **MK da batteri**

Questo tipo di cheratite che si sviluppa più frequentemente in situazioni in cui l'integrità epiteliale è compromessa: l'agente eziologico più comune è il batterio opportunisto *Pseudomonas aeruginosa*[16] Figura 1.4 , un Gram negativo che possiede una proteasi capace di distruggere la cornea in poche ore[14]. Va menzionato che alcuni batteri, e.g. *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus influenzae*, riescono però a penetrare l'epitelio anche se intatto.

#### **Sintomi[16]:**

- Sensazione di corpo estraneo;
- Fotofobia;
- Visione annebbiata;
- Dolore;
- Edema palpebrale;
- Secrezioni mucopurulenti;

#### **Segni (in ordine cronologico)[16]:**

- Congestione dei vasi congiuntivali e perilimbari;
- Difetto epiteliale con comparsa di infiltrati leucocitari ai margini;
- Espansione degli infiltrati in associazione a edema stromale;
- Uveite sterile secondaria con comparsa di materiale simil-purulento sterile in camera anteriore (ipopion);
- Progressiva ulcerazione che può portare a perforazione corneale e quindi a un'endofthalmitis batterica;

### **MK da funghi**

Sebbene rare, le infezioni della cornea causate da funghi, i.e. *cheratomicosi*, possono avere effetti devastanti[16] come la necrosi dello stroma e l'entrata in camera anteriore anche in presenza di membrana di Descemet intatta[16]. A penetrazione fungina avvenuta la cheratite diventa difficile da controllare anche a causa dello scarso potere penetrante degli agenti antimicotici[16]. La progressione di questo tipo di cheratite è più lenta e meno dolorosa di quella batterica.

I patogeni più comuni sono *Candida albicans* e i funghi filamentosi come *Aspergillus* Figura 1.5 e *Fusarium spp.* Le cheratiti sostenute da *Candida*

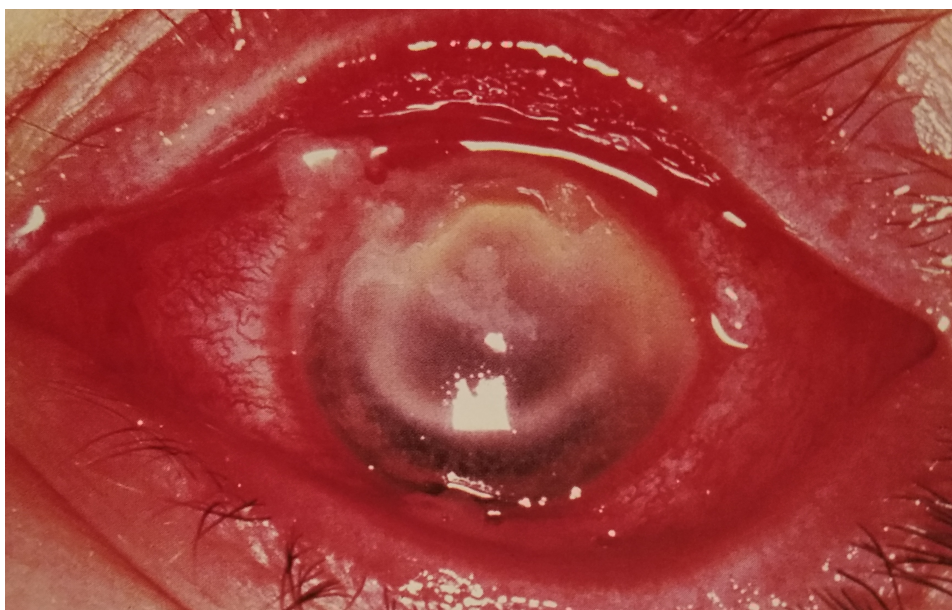


Figura 1.5: Questo è un caso di ulcera corneale a carico di *Aspergillus*. Si noti l'anello di infiltrati dal bordo non definito. Immagine tratta da: *J. H. Krachmer, D. A. Palay. Cornea Atlas. Elsevier. Third edition. 2014.*

tipicamente si sviluppano in associazione con pre-esistenti patologie corneali o con situazione immunodepressive mentre quelle da funghi filamentosi sono più comuni nelle aree agricole e si sviluppano da traumi oculari che coinvolgono materia organica come il legno[16].

**Sintomi[16]:**

- Sensazione di corpo estraneo;
- Visione annebbiata;
- Secrezioni;

**Segni (variano con l'agente infettivo)[16]:**

*a. Funghi filamentosi:*

- Grigiastro infiltrato stromale a margini indistinti;
- Circostanti lesioni satellite simili a piume circondate da un anello di infiltrati leucocitari;
- Possono presentarsi anche ipopion e una placca endoteliale;

*b. Candida:*

- Ulcera giallo-biancastra;

### 1.3. COMPLICAZIONI CORNEALI INDOTTE DA LENTI A CONTATTO21

#### **MK da *Acanthamoeba***

I membri del genere *Acanthamoeba* sono dei protozoi ubiquitari rinvenuti in aria, nel terreno e in acqua, sia dolce che salata. Possono esistere sia in forma vegetativa (*Trofozoiti*) che in forma quiescente (*Cisti*).

Le cisti sono molto resistenti e permettono al protozoo di sopravvivere per un lungo periodo di tempo in ambienti ostili come ad esempio le acque clorate di una piscina, ma anche in ambienti estremi come vasche d'acqua bollente o laghi ghiacciati[16]. Quando le condizioni ambientali tornano favorevoli, la cisti muta in trofozoite, il quale secreta una serie di enzimi che favoriscono sia la penetrazione nei tessuti che la loro distruzione[16].

L'epitelio corneale umano intatto è resistente all'azione dell'*Acanthamoeba*, ma è sufficiente anche una leggera abrasione corneale per rendere possibile l'insorgere di questa forma di cheratite Figura 1.6[16].

#### **Sintomi[16]:**

- Visione offuscata;
- Dolore severo, sproporzionato rispetto ai segni clinici;

#### **Segni (in ordine cronologico)[16]:**

- Congestione dei vasi perilimbari;
- Piccoli infiltrati irregolari nello stroma anteriore e perineurali;
- L'epitelio può essere intatto o manifestare una cheratite puntata o pseudo-dentritica;
- Una graduale espansione e coalescenza degli infiltrati può portare alla formazione di un ascesso centrale o paracentrale;
- Piccole lesioni bianche possono svilupparsi attorno all'ascesso;
- Lenta e progressiva opacizzazione dello stroma;
- Infiammazione della sclera (Sclerite);
- Rigonfiamento della membrana di Descemet (Descemetocel);

#### **1.3.2 Contact Lens Acute Red Eye (CLARE)**

Questa condizione Figura 1.7, conosciuta anche con il nome di *Sindrome da lente stretta (TLS: Tight Lens Syndrome)*, si osserva esclusivamente in concomitanza con l'EW, con un'incidenza che va dal 1,4% al 12,3% per le lenti idrogel e dal 1% al 3,8% per lenti SiHy [8].

Si tratta di una reazione infiammatoria della cornea e della congiuntiva dovuta ad esotossine rilasciate da batteri gram negativi, specialmente del genere *Pseudomonas*. **Sintomi [8]:**

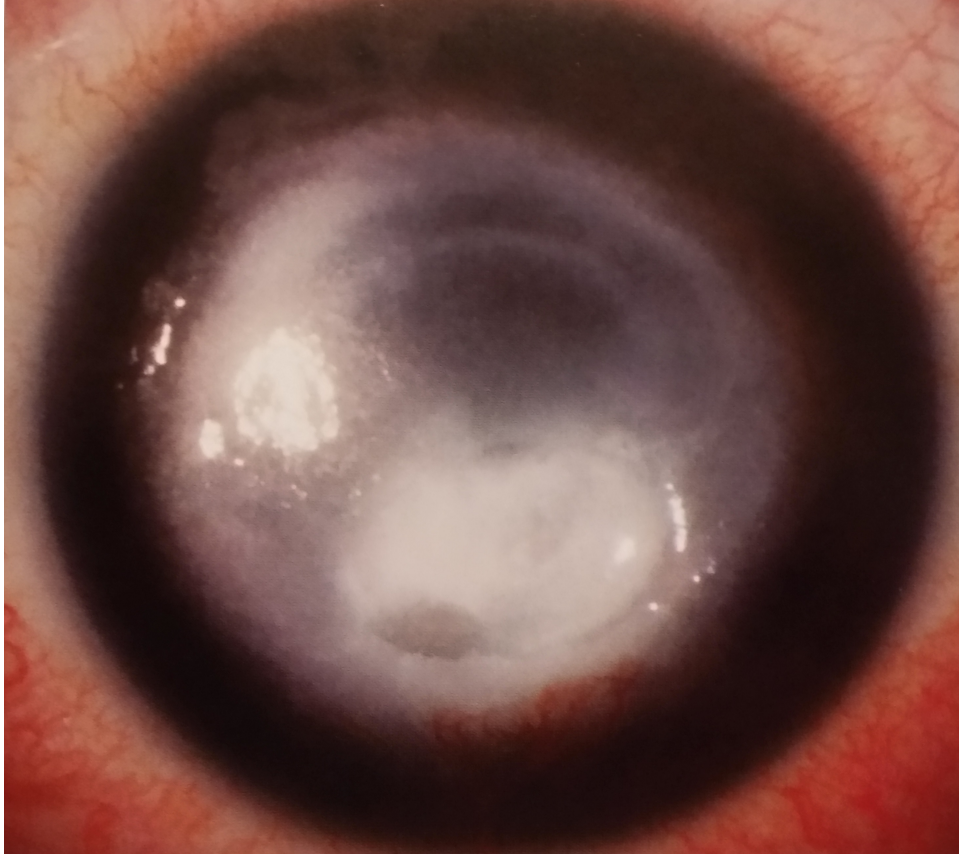


Figura 1.6: Questo è un caso di cheratite da *Acanthamoeba* con un caratteristica anello d'infiltrati. Questo particolare caso procede da 4 mesi nonostante i trattamenti e probabilmente il paziente avrà bisogno di un'operazione chirurgica. I vasi sanguigni presenti nella porzione inferiore della cornea segnalano un processo cronico in quanto i vasi impiegano settimane per formarsi. Immagine tratta da: *J. H. Krachmer, D. A. Palay. Cornea Atlas. Elsevier. Third edition. 2014.*



Figura 1.7: Caso esemplificativo di CLARE. Si notino l'intenso rossore bulbare e i vasi congestionati. Immagine tratta da: *Manuale per l'assistenza all'applicazione di Lenti a Contatto. The Vision Care Institute of Johnson 'n' Johnson Medical S.p.A.*

- Risveglio durante la notte per dolore acuto all'occhio;
- Discomfort della lente;
- Fotofobia;
- Lacrimazione;

**Segni [8]:**

- Acuta iperemia perilimbare e iperemia bulbare (i grado 2 CCLRU);
- Piccoli infiltrati diffusi nella cornea medio periferica;
- Ipopion in camera anteriore solo nelle forme più severe;

### 1.3.3 Contact Lens Peripheral Ulcer (CLPU)

L'ulcera periferica da lenti a contatto Figura 1.8 è una reazione infiammatoria della cornea in risposta alle esotossine di batteri gram positivi, e.g. *Staphylococcus spp.*, che si presenta con escavazione localizzata dell'epitelio, infiltrati e necrosi dello stroma anteriore con interessamento della membrana di Bowman [8].

Le cause possono essere:

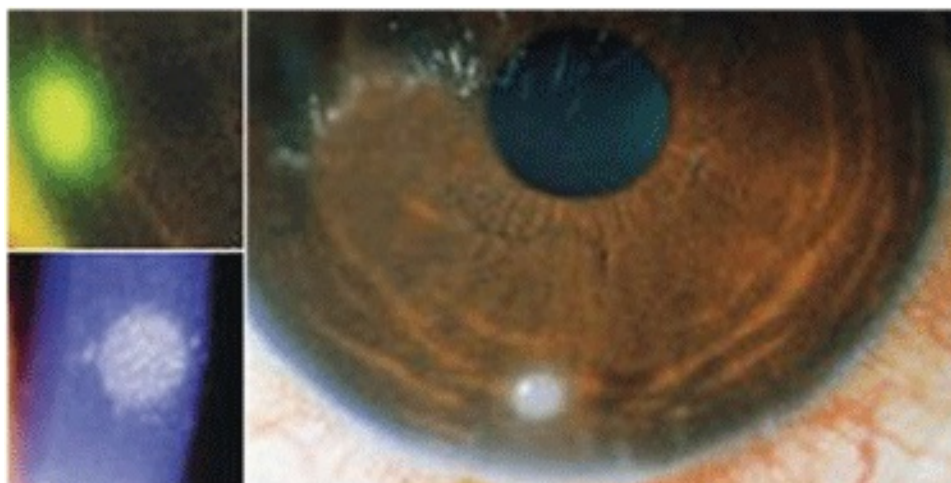


Figura 1.8: Tre differenti casi di CLPU. In alto a sinistra: CLPU evidenziata con fluoresceina. In basso a sinistra: CLPU osservata in illuminazione diretta. A destra: CLPU osservata in illuminazione diffusa. Immagine tratta da: *Joel A. Silbert. Is it an Ulcer or an Infiltrate?. Review of Optometry. 7/3/2007.*

- Contaminazione batterica delle lenti, delle soluzioni di manutenzione o del portalenti;
- Ipossia;
- Chiusura prolungata dell'occhio;
- Lente applicata stretta;
- Scarsa igiene;
- Reazione tossica alle soluzioni;
- Patologie dei margini palpebrali;
- Traumi meccanici;
- Denaturazione dei depositi;

L'incidenza varia sia col tipo di materiale usato che con il tipo di porto:

- 1-5% nei portatori di lenti a contatto DW (maggiore con lenti SiHy rispetto con lenti idrogel);
- 1-13% negli utilizzatori di lenti a contatto idrogel EW;
- 3,3-5,4% con SiHy EW;

### 1.3. *COMPLICAZIONI CORNEALI INDOTTE DA LENTI A CONTATTO*<sup>25</sup>

#### **Sintomi [8]:**

- Condizione asintomatica nel 50% dei casi;
- Intolleranza alle lenti a contatto;
- Sensazione di corpo estraneo;
- Fotofobia;
- Lacrimazione;
- Episodi di occhio rosso acuto;
- I sintomi si riducono notevolmente dopo la rimozione della lente;

#### **Segni [8]:**

- Moderata iperemia localizzata;
- Infiltrati sterili periferici o medio periferici di piccole dimensioni (0,2-2,00 mm), isolati, circolari;
- Infiltrati diffusi nella fase acuta se la condizione è severa;
- Può esservi ipopion se la condizione è severa;

#### **1.3.4 Infiltrative Keratitis (IK)**

In questa tipologia di cheratite dell'infiltrato sterile si forma nello strato anteriore dello stroma Figura 1.9 e differisce da quelli sviluppati in caso di CLPU, CLARE e MK.

Le cause possono essere:

- Ipossia;
- Prolungata chiusura dell'occhio;
- Lente applicata stretta;
- Tossine batteriche (*Staphylococcus* sp.);
- Denaturazione dei depositi;
- Reazione tossica alle soluzioni;
- Patologie dei margini palpebrali;
- Scarsa igiene;



Figura 1.9: Un infiltrato stromale localizzato in un portatore di lenti a contatto morbide. Non c'è nessun difetto epiteliale. Immagine tratta da: *J. H. Krachmer, D. A. Palay. Cornea Atlas. Elsevier. Third edition. 2014.*

### 1.3. COMPLICAZIONI CORNEALI INDOTTE DA LENTI A CONTATTO<sup>27</sup>

- Infezione da Adenovirus;
- Traumi meccanici;

#### **Sintomi:**

- Intolleranza alle lenti a contatto;
- Sensazione di corpo estraneo;
- Lacrimazione;
- Fotofobia;
- Episodi di occhio rosso acuto;

#### **Segni:**

- Lieve rossore oculare;
- Infiltrati stromali ad ore 4 e 8;
- Può esserci staining epiteliale bilaterale;

#### 1.3.5 Asymptomatic Infiltrative Keratitis (AIK)

In questa complicazione si formano dei piccoli infiltrati sterili a livello corneale in risposta a:

- Ipossia;
- Complicanze batteriche;
- Depositi sulle lenti a contatto;
- Reazione tossica alle soluzioni;
- Patologie dei margini palpebrali;
- Scarsa igiene;
- Infezione da *Adenovirus*;

#### **Sintomi:**

- Nessuno;

#### **Segni:**

- Piccoli infiltrati focali non colorabili nella cornea;

- Può essere presente un lieve staining corneale;
- Moderato rossore oculare e limbare;

Riassumendo, va ribadito come per evitare l'insorgenza di tali infezioni e complicazioni sia dunque indispensabile adottare una corretta routine di manutenzione delle lenti a contatto, ovvero seguire scrupolosamente le istruzioni fornite dal proprio optometrista, che prevedono l'igiene delle mani, la pulizia periodica del porta lenti e il corretto rimpiazzo della lente e della soluzione conservante.

## 1.4 Prodotti e strumenti per la cura delle LaC

L'operazione di manutenzione delle LaC può essere suddivisa in diverse fasi:

- *Pulizia;*
- *Disinfezione;*
- *Conservazione;*
- *Risciacquo;*

Per ognuna di queste fasi esistono appositi prodotti che in prevalenza consistono in soluzioni liquide contenenti determinati agenti chimici. Esistono anche sistemi fisici, come ad esempio quelli impiegati per la disinfezione termica o tramite raggi ultravioletti.

### 1.4.1 Disinfezione termica [1]

La disinfezione termica può essere utilizzata solo con le lenti a contatto morbide in quanto i polimeri utilizzati per le lenti RGP sono termoplastici e dunque deformabili con il calore. E' anche opportuno non sottoporre a questo trattamento le lenti idrogel con contenuto idrico superiore al 55%. Alcuni studi, tuttavia, hanno dimostrato che tali lenti possono essere sottoposte a cicli di disinfezione per un periodo non superiore a 6 mesi, senza subire evidenti variazioni strutturali.

I protocolli iniziali prevedevano l'immersione delle lenti in acqua distillata, in cui successivamente venivano disciolte delle pastiglie di sale [2]. Oggi viene utilizzata una soluzione salina isotonica al liquido lacrimale già pronta.

Il ciclo di disinfezione può durare dai 20 ai 50 minuti e le temperature raggiunte arrivano al massimo a 85-90°C.

Un'alternativa alla disinfezione termica classica delle LaC morbide recentemente introdotta è l'utilizzo del forno a microonde. E' stato dimostrato

che trattamenti ripetuti non inducono alterazioni clinicamente significative né del polimero né dei parametri. La soluzione in cui sono immerse le lenti può raggiungere i 100°C in pochi secondi, mentre il tempo necessario per la disinfezione non è mai superiore ai due minuti.

Viste le temperature raggiunte è necessario usare appositi portalenti (es. *Micro Clens*, *Oculi*) e soluzione salina ipotonica (0,75% per il *Micro Clens*), in quanto l'evaporazione di parte della soluzione determina un incremento della concentrazione elettrolitica.

#### 1.4.2 Disinfezione con raggi ultravioletti [1]

La radiazione ultravioletta (UV) è una parte dello spettro della radiazione elettromagnetica caratterizzata da un range di lunghezze d'onda inferiore a quello della luce visibile ( $< 380nm$ ) e superiore a quello dei raggi X ( $> 10nm$ ).

L'efficacia germicida degli UV-C, i.e. lunghezza d'onda  $< 280nm$ , si deve alla capacità delle radiazioni di indurre rotture a singolo e a doppio filamento (single-strand breaks e double-strand-breaks) nella struttura degli acidi nucleici del microrganismo bersaglio, provocandone la morte.

#### 1.4.3 I mezzi chimici di manutenzione [1]

Come detto in precedenza fanno parte di questa categoria tutte le soluzioni chimiche e i sistemi ossidanti che permettono la pulizia, la manutenzione e la conservazione delle lenti a contatto.

##### Prodotti per la pulizia [1]

La pulizia ha la funzione di rimuovere i depositi dalla superficie della lente, prevenendo la formazione del biofilm e favorendo la successiva fase di disinfezione. Per fare ciò vengono sostanzialmente utilizzati due tipi di prodotti: i *detergenti* e gli *enzimi*.

I detergenti agiscono principalmente nei confronti dei depositi lipidici e mucosali grazie all'azione dei tensioattivi contenuti. Un *tensioattivo* è una molecola formata da un gruppo idrofilo polare ed uno lipofilo non polare capace di rendere solubili all'acqua i depositi lipidici.

I tensioattivi si distinguono in *anionici* (con ione negativo), *cationici* (con ione positivo) e *non ionici* (elettricamente neutri). Questi ultimi sono quelli maggiormente oculo-compatibili.

Fra le sostanze utilizzabili come detergenti ci sono il *cloruro di benzalconio* e la *clorexidina* che possiedono anche attività disinfettante e perciò saranno descritte nel dettaglio in seguito.

Esistono anche detergenti a base di alcool come l'*alcool isopropilico* che, in soluzione al 20%, agisce come solvente non acquoso in grado di alterare i

legami crociati di alcuni materiali, e.g. i polimeri a base di *fluoro-silossano-metacrilato*.

In una soluzione detergente possono essere aggiunti anche agenti emollienti e stabilizzatori della schiuma in modo che la soluzione sia più stabile e che la fase di risciacquo risulti più agevole.

Alcune nuove formulazioni includono la presenza di sferule microscopiche con azione abrasiva per aumentare il potere d'azione del tensioattivo, ma è stato dimostrato che l'uso di queste particelle può indurre delle variazioni nei parametri delle lenti corneali in *fluoro-silossano-acrilato*.

La detersione va effettuata giornalmente e ogni qual volta si rimuove la lente dall'occhio prima di disinfettarla e riporla nel portalenti per la conservazione.

Gli enzimi vengono usati per eliminare e/o ridurre la presenza dei depositi proteici presenti sulla superficie delle LaC, cosa che un semplice detergente non riesce a fare. Di norma il trattamento viene prescritto con cadenza settimanale.

Un *enzima* è una proteina catalizzatrice che accelera, anche di milioni di volte, la velocità di reazioni biochimiche in grado di verificarsi spontaneamente. Esso è in grado anche di alterare il legame tra depositi e superficie della lente, generando sostanze a più basso peso molecolare e più solubili. L'azione enzimatica è particolarmente efficace contro i depositi proteici denaturati che si formano sulle LaC in *silossano-acrilato*.

Gli enzimi utilizzati in contattologia possono avere origine *vegetale* (e.g. *Papaina*), *animale* (e.g. *Pancreatina*) e *sintetica* (e.g. *Subtilisina A*). Il più noto fra questi è la *Papaina* che è estratta dal lattice della *Papaya* carica e si colloca nel gruppo degli enzimi ad azione singola, ossia che si limitano ad idrolizzare il legame peptidico esistente fra i diversi amminoacidi delle singole subunità proteiche.

Gli enzimi ad azione multipla invece possono dimostrarsi efficaci anche per la rimozione di depositi in forma di conglomerati di proteine, lipidi e calcio e di solito contengono anche *etilendiamminotetracetico* (EDTA), un agente chelante che sequestra il calcio disciolto, impedendone la ri-precipitazione.

In genere è necessario risciacquare abbondantemente la lente per evitare il contatto degli enzimi con l'occhio. Anche per tale motivo è raccomandabile eseguire il trattamento prima della conservazione-disinfezione della lente.

### **Prodotti per la disinfezione [1]**

La soluzione ideale per la disinfezione delle lenti dure dovrebbe dimostrare di avere un'elevata capacità antisettica associata con proprietà quali una ridotta tossicità oculare e una ridotta tendenza all'accumulo sulle superfici della lente.

Esistono due diversi metodi di disinfezione chimica: la disinfezione con *soluzioni chimiche* e quella con *sistemi ossidanti*.

Le soluzioni chimiche sono quelle di prima scelta per la disinfezione delle lenti RGP in quanto queste non sono compatibili con il processo termico e la conservazione nel perossido d'idrogeno (sistema ossidante) può causare ammorbidimento delle superfici della lente, con possibile deterioramento in caso di successivo impiego di detergenti tensioattivi.

La maggior parte delle soluzioni per lenti morbide può essere utilizzata anche per le rigide, ma non essendo state ottimizzate per l'uso con quest'ultime esse vengono prescritte raramente, nonostante i principi attivi utilizzati siano pressappoco gli stessi. Alcune delle sostanze antisettiche più usate sono:

- *Cloruro di Benzalconio (BAC 0,002-0,02%)*: si tratta di un tensioattivo cationico derivato dall'ammonio quaternario che interferisce con la respirazione e la glicolisi delle cellule viventi, infatti il BAC possiede un polo lipofilo che si attacca alla parte lipidica della membrana cellulare determinandone la rottura e quindi la morte del microorganismo. Il BAC viene impiegato solitamente con le lenti rigide perchè la parte carica positivamente del composto tende a legarsi al polimero idrogel che presenta una carica negativa. Per lo stesso motivo il suo uso è stato messo in discussione per le lenti rigide in silossano-acrilato.
- *Thimerosal (0,002-0,007%)*: è un antisettico mercuriale che libera ioni contenenti mercurio in grado di penetrare nelle cellule e bloccare gli enzimi della catena respiratoria. A concentrazioni intorno a 0,003% e con pH simile a quello delle lacrime (7,4 – 7,5) mostra un tempo di azione di sei ore contro batteri e funghi. Il suo uso è stato limitato a causa della frequenza relativamente elevata di reazioni tossiche dell'epitelio corneo-congiuntivale.
- *Nitrato di Fenilmercurio (0,004%)*: come il thimerosal è un sale mercuriale che però è stato utilizzato principalmente per alcune soluzioni multifunzionali di cui si parlerà in seguito.
- *Clorobutanolo (0,4%)*: è una sostanza antisettica a base alcolica che è stabile in ambiente acido ma non a valori di pH usati per le soluzioni contattologiche, inoltre è piuttosto volatile per cui la concentrazione nel flacone conservato tende ad abbassarsi. Le soluzioni disinfettanti di clorobutanolo generalmente contengono anche altre sostanze antimicrobiche, ad esempio il BAC 0,002%.
- *Alcool benzile (0,1%)*: nonostante sia composto da una molecola bipolare, viene utilizzato anche per la disinfezione di lenti con carica negativa in quanto la sua carica è ridotta e quindi il legame con la superficie diventa trascurabile.
- *Clorexidina (0,002-0,006%)*: come il BAC è un tensioattivo cationico che rompe la membrana con fuoriuscita del materiale citoplasmatico.

Viene raramente usato sia perchè ha una limitata efficacia contro funghi e *Serratia marcescens*, sia per l'elevato assorbimento superficiale, in special modo se vi sono depositi proteici. La clorexidina è però efficace contro l'*Acanthamoeba*. Viene talvolta associata con il thimerosal per aumentare lo spettro battericida.

- *Poliaminopropil biguanide (0,0004%)*: è un derivato della clorexidina caratterizzato da un'elevata attività antibatterica che ne permette l'utilizzo a basse concentrazioni. Inoltre l'assorbimento superficiale è di gran lunga inferiore a quello della clorexidina.
- *Composti di ammonio quaternario*: hanno proprietà tipiche dei tensioattivi cationici e sono efficaci contro batteri Gram positivi e, a più alte concentrazioni, contro alcuni batteri Gram negativi. Sono poco efficaci contro i virus ed inefficaci contro le spore.

I sistemi ossidanti sono sistemi non preservati a base di *perossido d'idrogeno* o di *cloro* o ancora di *sodio perborato*.

Il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) è una sostanza costituita da una molecola di acqua a cui è legato un atomo di ossigeno.

In contattologia viene utilizzato principalmente ad una concentrazione del 3% che permette una completa disinfezione della lente in 10 minuti.

Le soluzioni al perossido d'idrogeno devono essere neutralizzate prima dell'inserzione della lente sull'occhio perchè il perossido è altamente irritante per i tessuti oculari. Esse possono contenere:

- catalizzatori metallici (es. *platino*) o enzimatici (es. *catalasi di derivazione bovina*). La funzione del catalizzatore è quella di scindere il perossido in acqua e ossigeno che si libera nell'aria;
- reattivi chimici, come il *piruvato di sodio* o il *tiosolfato di sodio*, che iniziano la reazione di ossido-riduzione che causa la decomposizione del perossido;
- sistemi diluenti per mezzo dei quali il perossido viene disattivato tramite immersione e risciacquo in soluzione salina.

Se il portatore dovesse applicare le lenti omettendo la fase di neutralizzazione, la reazione di dolore oculare risulta intensa ed è accompagnata da iniezione e chemosi congiuntivale, fotofobia e lieve colorazione epiteliale dopo aver instillato la fluoresceina. In tal caso il soggetto deve astenersi dall'usare le lenti a contatto per uno-due giorni, corrispondenti al tempo necessario per la risoluzione dei sintomi.

I sistemi di neutralizzazione possono essere attivati in una o due fasi. I sistemi ad una fase sono più comodi per l'utilizzatore, ma quelli bifasici assicurano un'ottimale disinfezione poiché sono completamente attivi sino

al momento in cui non viene aggiunto l'elemento neutralizzante. I sistemi a base di cloro contengono un ingrediente attivo, come il *dicloroisocianurato* o il *para-diclorosulfamol acido benzoico*, che viene disciolto in soluzione salina non preservata. Sebbene i sistemi a base di cloro siano semplici da utilizzare ed economici, il loro uso è limitato a causa della scarsa efficacia nell'eliminazione di alcuni microrganismi, in particolare l'*Acanthamoeba*.

Questo tipo di sistema non dovrebbe essere prescritto a soggetti con secrezione lacrimale con abbondanti elementi organici che si possono depositare sulla lente in quanto il cloro reagisce in presenza di materiale organico.

Il *sodio perborato* posto in soluzione salina libera di perossido d'idrogeno allo 0,1% e il tempo di contatto minimo con le lenti deve essere di almeno 6 ore. Non ha bisogno di essere neutralizzato.

### Preservanti [1]

Le stesse sostanze usate per la disinfezione possono essere adatte per prevenire la crescita dei microrganismi che possono incidentalmente venire a contatto con la soluzione dopo l'apertura del flacone. Oltre ai composti antisettici menzionati precedentemente ne sono correntemente in uso degli altri, noti per le loro proprietà batteriostatiche, e.g. l'*acido sorbico* e l'*etilendiamminotetracetico (EDTA 0,1.0,01%)*. L'EDTA è un agente chelante che complessa gli ioni calcio e magnesio presenti nelle membrane cellulari batteriche: in tal modo il microrganismo viene reso maggiormente vulnerabile all'azione del composto antisettico.

### Soluzioni multifunzionali o Multi Purpose Solutions (MPS) [1]

Le soluzioni uniche o multi-purpose-solutions (MPSs) sono oramai diventate i prodotti più raccomandati per la cura delle LaC: l'85% dei professionisti ne consiglia l'utilizzo ai propri clienti [2].

Queste soluzioni riuniscono in un unico prodotto la maggior parte delle funzioni necessarie alla manutenzione della LaC e risultano composte da:

- *agente antisettico e preservante*: più frequentemente il *Poliaminopropil biguanide (PHMB)* ma anche composti dell'ammonio quaternario (*Poliquad*);
- *agente chelante*: tipicamente EDTA;
- *sistema tampone*;
- *agente viscosizzante*;
- *tensioattivo*;

L'uso di una soluzione unica trova la sua ragione nella necessità di semplificare le procedure di manutenzione, in modo da favorire la compliance del portatore. Lo svantaggio principale è la possibilità che l'efficacia sia ridotta rispetto all'uso integrato di più soluzioni monofunzionali, ricordando che tale efficacia è influenzata anche dal materiale della LaC e dal tipo di formulazione[17].

Alcune soluzioni sono vendute come *no-rub*, ossia non richiedono lo sfregamento della lente per pulirla. L'organizzazione internazionale per la normazione (ISO) vorrebbe tuttavia revisionare le correnti normative sull'utilizzo dei prodotti di manutenzione per le LaC, incoraggiando una nuova promozione dell'importanza dello sfregamento meccanico e del successivo risciacquo della lente a contatto [2].

## 1.5 Il problema del portamenti e della compliance

Le soluzioni per la conservazione delle LaC devono dunque essere rimpiazzate dopo ogni utilizzo della lente per evitarne la contaminazione e quindi ridurre il rischio di contrarre un'infezione[18]. Non seguire le corrette indicazioni per la sostituzione delle soluzioni usate è considerato però un fattore di rischio anche per un tipo di contaminazione completamente distinta, ossia quella del portamenti[18].

Come detto precedentemente, la contaminazione del portamenti occorre circa nell'85% dei casi di portatori asintomatici [3]. Uno studio ha comparato la flora microbica formatasi sulle lenti a contatto, nel portamenti e nelle soluzioni di conservazione di 126 soggetti dopo 270 giorni di porto delle lenti [19]. Nonostante ai soggetti fosse stato detto di seguire alcune istruzioni per una corretta igiene durante il porto, la contaminazione dei portamenti si è verificata nell'80,95% dei casi, mentre quella delle soluzioni di conservazione nel 63,09%. ciò ha fatto intuire che i soggetti in studio non abbiano seguito le istruzioni. Nel medesimo studio la contaminazione è risultata essere significativamente inferiore nei portamenti usati per un periodo massimo di 3 mesi.

Oltre al non corretto rimpiazzo delle soluzioni altri fattori di rischio per la contaminazione del portamenti sembrano essere[18]:

- Tempo di porto della lente  $> 12ore$ ;
- Età del portamenti;
- Uso delle lenti durante il nuoto;
- Appartenenza al genere maschile (statisticamente le donne sono più complianti);

Il portamenti dovrebbe essere pulito ogni 3-4 giorni usando un piccolo spazzolino da denti o un cotton fioc impregnato di detergente per lenti a contatto

che deve essere sfregato su ogni parte del contenitore in modo da rimuovere la placca di biofilm.

Dopo averlo risciacquato con soluzione salina nuova deve essere lasciato ad asciugare aperto all'aria per circa 15 minuti, meglio se protetto dalla polvere con un fazzoletto di carta [1].

La sostituzione periodica del portamenti (1-3 mesi in genere) dovrebbe essere programmata dal contattologo.

Recentemente, al fine di ridurre il rischio di contaminazione del portamenti, sono stati sviluppati nuovi design nonché materiali innovativi. Fra questi il presente lavoro di tesi si focalizza sull'impiego di polimeri plastici addizionati di un nobile materiale dalle già note capacità antimicrobiche: l'argento.

## 1.6 L'argento in contattologia

L'argento è un metallo che presenta proprietà antimicrobiche note fin dall'antichità, quando, sotto forma di recipiente, veniva utilizzato per la purificazione dell'acqua potabile o per la conservazione delle bevande[20]. Nei suoi composti più moderni viene impiegato come principio attivo di nano particelle dall'ampio spettro d'azione microbica, grazie alla sua capacità di [21][22]:

- inibire la replicazione dei microbi interferendo con il DNA e l'RNA;
- distruggere la membrana cellulare;
- ostacolare la respirazione cellulare;
- inattivare e alterare la conformazione degli enzimi.

In ambito sanitario l'utilizzo dell'argento è di fatto ben consolidato. I cateteri ricoperti in argento, usati per più di una settimana, riducono significativamente l'incidenza di batteriuria asintomatica negli adulti ospedalizzati e possono essere più efficaci dei cateteri rivestiti con antibiotici usati per lo stesso periodo[9].

L'argento è stato usato anche per il rivestimento di tubi endotracheali: studi *in vivo* hanno dimostrato un'associazione con ridotta mortalità dei pazienti affetti da polmonite da ventilazione meccanica (VAP)[9].

Altri pregi dell'argento sono il difficile e raro sviluppo di una resistenza da parte dei batteri[9] e la sua atossicità per le cellule animali. L'argento, infatti, solo se assorbito in elevate quantità può causare *argiria*, ossia un'alterazione della cute che si colora di blu-grigio. In determinate circostanze si può verificare anche argiria oculare: in tal caso è l'occhio ad assumere tali tinte[22].

Anche in contattologia l'argento sta trovando i suoi utilizzi, sia come rivestimento delle lenti a contatto[15] sia come elemento integrante il polimero di una lente morbida[21].

Nel primo caso uno studio condotto da Willcox[15] ha verificato gli effetti sulla crescita e la colonizzazione batterica su una lente in *etalficoln A* lasciata in ammollo in una sospensione colloidale di nano-particelle d'argento a diverse concentrazioni. I batteri utilizzati nei test erano *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*: l'adesione di questi ultimi alla lente rivestita in argento si dimostrò inferiore rispetto alle LaC di controllo. Nello specifico, si è notata una risposta dose-dipendente: entrambi i tipi di batteri vengono pressochè uccisi quando aderiscono sulle LaC lasciate nella soluzione a 20 ppm d'argento, mentre non è emersa alcuna azione antibatterica sulle LaC lasciate nella soluzione a 0,5 ppm.

In un altro studio *in vitro*[21] è stata testata l'efficacia antibatterica di un dischetto di materiale idrogel con nano-particelle d'argento inserite nel polimero. I batteri testati sono gli stessi dello studio precedente e, per concentrazioni superiori a 20,71  $\mu\text{g}$  di nano-particelle/dischetto, si è verificata inibizione della crescita batterica, per altro più marcata per *P. aeruginosa* rispetto a *S. aureus*.

Per quanto riguarda i portamenti, come accennato alla fine del precedente paragrafo, sono attualmente disponibili sul mercato modelli che contengono ioni d'argento conglobati nel polimero plastico. Un esempio di portamenti in commercio fino a qualche tempo fa era il *MicroBlock* prodotto dalla CIBA Vision Corporation, recentemente acquisita da Alcon.

Un'indagine pilota[22] è andata a testarne la performance rispetto a dei semplici portamenti di materiale plastico, inoculando nelle coppette del portamenti una sospensione batterica a concentrazione nota. Il numero di colonie batteriche recuperate dal *MicroBlock* è risultato statisticamente e significativamente inferiore rispetto a quello dei portamenti convenzionali ( $P < 0,001$ ).

Il principio su cui si basa l'effetto microbicide di questo tipo di portamenti è il rilascio di cationi  $\text{Ag}^+$  nella soluzione. Anche se gli ioni  $\text{Ag}^+$  possono entrare in contatto con i tessuti oculari, tuttavia non sussiste il rischio né di reazioni allergiche né di sviluppare argiria in seguito ad esposizione cronica, in quanto la quantità d'argento che viene a contatto con l'occhio è estremamente bassa. Si è calcolato che tale concentrazione di argento è di circa di  $11,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{giorno}$ , livello che per un adulto è circa 26.000 volte inferiore alla dose tossica stabilita dall'agenzia statunitense EPA.

## 1.7 Scopo della tesi

Nel capitolo successivo si procederà all'illustrazione di prove pilota, effettuate presso il Laboratorio di Igiene e Sanità Pubblica del Dipartimento di

Medicina Molecolare dell'Università di Padova, mirate alla valutazione dell'effettiva attività antibatterica di due portamenti in plastica, attualmente commercializzati da due aziende distinte, che fanno uso della tecnologia a rilascio di ioni argento.

Come termine di confronto per i due portamenti testati, che verranno d'ora in avanti chiamati *campione 1* (C1) e *campione 2* (C2), si è utilizzato un portamento classico, ovvero realizzato in materiale plastico non addizionato di ioni argento e quindi con attività antibatterica propria nulla. Il principio della prova è rappresentato dall'inoculo dei portamenti con una coltura batterica a concentrazione cellulare nota e la successiva determinazione del numero di microrganismi vitali persistenti dopo determinati tempi di incubazione.

Gli articoli indipendenti sull'argomento sono esigui e si ritiene che maggiori test siano utili per la messa a punto di un materiale per portamenti che non solo garantisca un'applicazione con rischi di contaminazione ridotta ma anche fornisca un aiuto all'azione dei disinfettanti.

La prospettiva ottimale per il futuro sarebbe lo sviluppo di un materiale per portamenti con un'attività antibatterica abbastanza elevata da permettere di ridurre l'aggressività delle soluzioni per la manutenzione e quindi ridurre le possibilità di reazioni allergiche o tossiche a queste ultime.



## Capitolo 2

# MATERIALI E METODI

Il protocollo sperimentale seguito si basa su quanto indicato dalla norma ISO 22196:2011[23], recante “*Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*”, la quale va a disciplinare le procedure analitiche necessarie per la misurazione dell’attività antimicrobica di materiali plastici. Fatta eccezione per alcune variazioni che verranno debitamente segnalate e motivate, i materiali ed i metodi impiegati sono pertanto i medesimi indicati nella suddetta norma.

Le modifiche introdotte alle metodiche suggerite dalla norma ISO sono in parte conseguenti a quanto emerso dalla ricerca bibliografica preliminare e, in particolar modo, da un precedente studio che ha seguito un design sperimentale coerente con lo scopo della presente tesi[24] .

### 2.1 Materiali plastici testati

I test per la valutazione dell’attività microbica sono stati condotti utilizzando direttamente i portamenti, così come reperibili in commercio. Sono stati testati due differenti tipi di portamenti a rilascio di ioni argento, C1 e C2, di cui però non è nota né la composizione esatta del polimero, né tanto meno la concentrazione di ioni argento. Come riferimento o bianco per valutare l’attività antibatterica ci siamo serviti di un portamenti realizzato senza alcun additivo microbica al polimero plastico.

### 2.2 Ceppi batterici utilizzati

Come da normativa, sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici:

- *Staphylococcus aureus ATCC 6538P*;
- *Escherichia coli ATCC 8739*;

Nonostante le due specie batteriche non siano di diretto interesse oftalmologico, essi sono considerati come rappresentativi delle due maggiori divisioni di procarioti, ovvero i Gram positivi (*S. aureus*) ed i Gram negativi (*E. coli*) e pertanto di utilizzo pressoché obbligato nel caso di esecuzione di prove preliminari, quali quelle descritte nel presente elaborato.

### 2.3 Reagenti, mezzi di coltura e soluzioni.

- *1/500 Nutrient broth (NB)*: il nutrient broth è stato preparato sciogliendo 3,0 g di estratto di carne, 10,0 g di peptone e 5,0 g di cloruro di sodio in 1000 ml di acqua distillata. Il prodotto in seguito è stato diluito con acqua distillata in rapporto 1:500 ed infine sterilizzato in autoclave a 121 °C per 15'.
- *Nutrient agar*: questo terreno di coltura è stato realizzato sciogliendo 5,0 g di estratto di carne, 10,0 g di peptone, 5,0 g di cloruro di sodio e 15,0 g di agar in polvere in 1000 ml di acqua distillata. In seguito la beuta è stata messa a bagnomaria nell'acqua bollente fino al totale dissolvimento della polvere. Dopo sterilizzazione in autoclave il Nutrient agar viene dispensato in provette sterili in aliquote da 10 ml. L'agar viene fatto solidificare all'interno dei tubi con un'inclinazione di circa 15° rispetto al piano orizzontale, ottenendo così delle provette "a becco di clarino" (*slant*).
- *Plate Count Agar (PCA)*: è stato preparato sciogliendo 2,5 g di estratto di lievito, 5,0 g di triptone, 1,0 g di glucosio e 15,0 g di agar in polvere in 1000 ml di acqua distillata. In seguito la beuta è stata messa in un bagno d'acqua bollente fino al totale dissolvimento dell'agar. Infine è stato sterilizzato in autoclave.
- *SCDLP broth*: viene preparato sciogliendo 17,0 g di peptone di caseina, 3,0 g di peptone di soia, 5,0 g di cloruro di sodio, 2,5 g di disodio idrogeno fosfato, 2,5 g di glucosio e 1,0 g di lecitina in 1000 ml di acqua distillata. Dopo aver mescolato attentamente il composto sono stati aggiunti 7,0 g di surfattante non ionico. Infine, il tutto è stato sterilizzato in autoclave, dopo aver portato il pH in un intervallo compreso fra 6,8 e 7,2.
- *Tampone fosfato (PBS)*: la soluzione è stata preparata versando 34,0 g di potassio fosfato monobasico in un matraccio da 1000 ml. In seguito abbiamo aggiunto 500 ml di acqua distillata e mescolato fino al dissolvimento del potassio fosfato monobasico. Dopo aver regolato il pH ottenendo un valore compreso fra 6,8 e 7,2, abbiamo aggiunto altri 500 ml di acqua distillata e infine sterilizzato tutto in autoclave.

- *Soluzione salina fisiologica con tampone fosfato*: la soluzione salina fisiologica 0.85% è stata preparata sciogliendo 8,5 g di cloruro di sodio in 1000 ml di acqua distillata: questa è stata poi usata per diluire 1:800 il tampone fosfato (vedi punto precedente). La soluzione finale è stata sterilizzata in autoclave e, successivamente, distribuita in provette a fondo conico in aliquote da 9 ml. Le provette sono state utilizzate per la preparazione delle diluizioni scalari della sospensione batterica testata.

## 2.4 Strumenti e consumabili

- *Sterilizzatore a calore secco* in grado di mantenere la temperatura tra 160° C e 180° C con una variazione massima di  $\pm 2^\circ$  C in condizioni di equilibrio;
- *Autoclave* in grado di mantenere la temperatura di  $(121 \pm 2)^\circ$  C e la pressione di  $(103 \pm 5)$  kPa;
- *Cappa a flusso laminare* per microbiologia;
- *Bagnomaria*;
- *pHmetro*;
- *Bilancia elettronica* con sensibilità di  $\pm 0,01$  g;
- *Pipette sterili monouso* da 10 ml;
- *Spipettatore automatico LaboPet*;
- *Micropipette di precisione Gilson P1000 sterili* con puntali sterili da 1000  $\mu$ l;
- *Incubatore termostato* 37° C;
- *Vortex*;
- *Anse sterili*;
- *Provette sterili con tappo a vite*;
- *Piastre petri sterili* con diametro da 90 mm;
- *Beute, bottiglie, e altra vetreria sterile*;
- *Lettore Densimat* per misurare la densità cellulare in McFarland. In Tabella 2.1 è riportata la conversione tra McFarland e cell/ml.

Tabella 2.1: Conversione tra McFarland e cell/ml. Una densità di 1 McFarland equivale ad avere  $3,0 \times 10^8$  cell/ml.

McFarland Standard	Cell/ml ( $\times 10^8$ )
0,5	1,5
1,0	3,0
2,0	6,0
3,0	9,0
4,0	12,0

## 2.5 Protocollo analitico

Essendo queste delle prove pilota, i protocolli delle singole prove effettuate hanno subito delle variazioni per cercare di arrivare a quello più idoneo per lo svolgimento futuro di test maggiormente approfonditi.

In sintesi, sui due campioni C1 e C2 sono state effettuate 4 prove distinte e, rispettivamente, 2 prove con inoculo di *Escherichia coli* e 2 prove con inoculo di *Staphylococcus aureus*. Avendo a disposizione 8 portamenti per tipo ne sono stati usati 4 per *E. coli* e 4 per *S. aureus*, poi riutilizzati nelle prove successive dopo essere stati lavati e disinfettati.

L'attività analitica si basa sull'inoculo iniziale del materiale da testare, in questo caso si tratta dei portamenti C1 e C2, con una soluzione batterica a concentrazione nota, che viene poi lasciata a contatto col materiale per determinati periodi di tempo. I risultati ottenuti, espressi in cellule vitali recuperate per ml (cell/ml). Come indicato dalla norma ISO, tali dati analitici vengono in seguito rielaborati per determinare l'attività antibatterica che caratterizza il materiale (cfr. 2.5.6)

Si presenta di seguito il protocollo analitico così come utilizzato.

### 2.5.1 Preparazione della sospensione batterica

I due ceppi standard (cfr. 2.2) si presentano sotto forma di dischetti congelati a  $-20$  °C: vengono ripristinati appoggiandoli in una piastra contenente terreno agar non selettivo *TSA (triptone soia agar)* e, una volta sciolti, la goccia viene seminata a tappeto con ansa sterile. In seguito le piastre vengono incubate per 24 ore a  $37$ ° C.

Trascorse le 24 ore, utilizzando un'ansa sterile, viene prelevata un'aliquota batterica dalla piastra che si risemina in provetta contenente del NA a becco di clarino. Tale provetta, che presenta un minor rischio di contaminazione della coltura, viene incubata nuovamente per 24 ore a  $37$ ° C.

A partire da questa coltura in provetta viene realizzata la sospensione di inoculo, prelevando batteri con ansa sterile e stemperandoli in soluzione

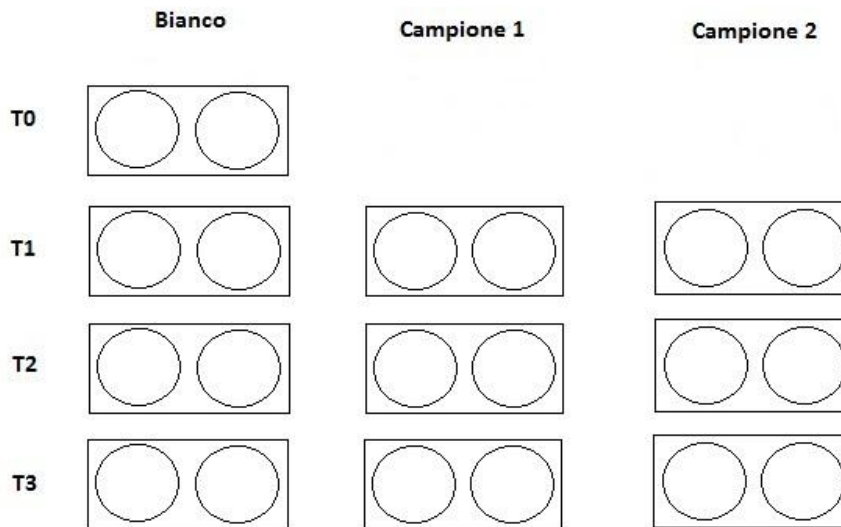


Figura 2.1: Schema dell'organizzazione dei campioni.

1/500 di NB fino a raggiungere la densità cellulare desiderata, pari a circa 1 *McFarland*, quantificandola tramite l'utilizzo del *Densimat*.

Successivamente 1 ml della sospensione batterica ottenuta viene diluito in 100 ml di NB, arrivando così ad avere una soluzione con densità batterica dell'ordine delle  $10^6$  cell/ml.

### 2.5.2 Inoculo dei campioni

Prima di procedere all'inoculo, i portamenti sono stati tenuti una notte sotto raggi UV-C e risciacquati, sotto cappa, con acqua distillata sterile.

Vengono disposti sotto cappa 4 portamenti non trattati e 3 per ognuno dei due campioni, questo perchè consideriamo il *bianco* al  $T_0$  come riferimento unico Figura 2.1 .

Il primo bianco è stato tenuto sotto cappa per essere subito seminato ( $T_0$ ) mentre gli altri sono stati messi in incubatore a  $37^\circ$  C per i seguenti intervalli di tempo: 4 ore ( $T_1$ ), 8 ore ( $T_2$ ) e 24 ore ( $T_3$ ).

### 2.5.3 Semina delle piastre di coltura

Trascorso il tempo di incubazione, i campioni sono stati rimossi dall'incubatore e riportati sotto cappa per la semina in piastra. La sospensione batterica prelevata da ogni campione è stata trasferita in provette sterili. In queste ultime sono stati complessivamente aggiunti 9 ml di SCDLP (cfr. 2.3), effettuando di fatto una diluizione 1:10, serviti per il lavaggio di ogni

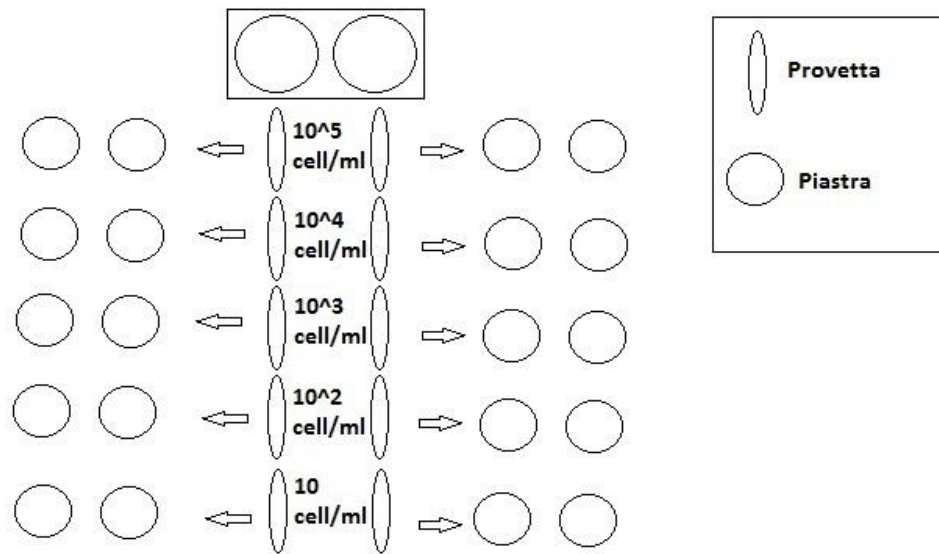


Figura 2.2: Organizzazione schematica della semina per ogni portamenti.

coppetta. Il passaggio di risciacquo è previsto dalla normativa e serve per recuperare il maggior numero di cellule possibili.

Dalla provetta contenente lo SCDLP (concentrazione batterica dell'ordine di  $10^5$  cell/ml) si preparano delle diluizioni scalari, sempre con fattore di diluizione 1:10 ( $10^4$  cell/ml,  $10^3$  cell/ml,  $10^2$  cell/ml, 10 cell/ml). Non conoscendo a priori l'effettivo potere antimicrobico del materiale, infatti, bisogna allestire la serie di diluizioni onde essere sicuri di ottenere piastre ricadenti nel range di lettura valido, i.e. dalle 30 alle 300 unità formanti colonia (UFC) per piastra. Per ciascuna provetta e diluizione, inoltre, si lavora *in doppio*, ovvero si seminano due piastre Figura 2.2.

La tecnica di semina è quella *per inclusione*: dopo aver inoculato la sospensione nelle piastre petri viene versato del terreno agar PCA (cfr. 2.3) sciolto ( $T = 45-50^\circ\text{C}$ ). Le piastre vengono mescolate e lasciate sotto cappa fino a completa solidificazione e solo in seguito vengono messe in incubatore a  $37^\circ\text{C}$  per 24 o 48 ore, rispettivamente per *E. coli* e *S. aureus*.

#### 2.5.4 Lettura delle piastre e analisi dati

La lettura delle piastre consiste nella conta delle colonie batteriche cresciute in ciascuna piastra al termine del periodo di incubazione. Vengono reputate non contabili (n.c.) le piastre in cui le colonie sono cresciute talmente fitte da non essere distinguibili l'una dall'altra. Come detto in precedenza, il range di lettura valido va dalle 30 alle 300 UFC/piastra e pertanto sono

state escluse dall'analisi dati tutte quelle piastre con conte non rientranti in tale intervallo.

Per determinare il numero di cellule batteriche vitali recuperate abbiamo applicato la seguente formula:

$$N = CxD$$

Dove:

- $N$  è il numero di cellule batteriche recuperate per ml;
- $C$  è il numero di UFC letto sulla piastra;
- $D$  è il fattore di diluizione "complessivo", ossia includente anche la diluizione 1:10 con SCDLP.

I risultati ottenuti da ogni replica sono stati mediati fra loro in modo da ottenere un solo valore per ogni portamenti.

### 2.5.5 Condizioni di validità del test

La singola prova è dichiarata valida quando si verificano le tre seguenti condizioni:

- E' soddisfatta la formula sottostante:

$$(L_{max} - L_{min}) / (L_{mean}) \leq 0,2$$

Dove:

- $L_{max}$  è il logaritmo in base 10 del massimo numero di batteri recuperati dal bianco a  $T_0$ ;
  - $L_{min}$  è il logaritmo in base 10 del minimo numero di batteri recuperati dal bianco a  $T_0$ ;
  - $L_{mean}$  è il logaritmo in base 10 della media dei due valori precedenti.
- Le cellule batteriche recuperate dal bianco al  $T_0$  deve essere dell'ordine delle  $10^6$  cell/ml;
  - Le cellule batteriche recuperate dal bianco a  $T_2$  devono essere maggiori di  $10^4$  cell/ml.

### 2.5.6 Determinazione dell'attività antibatterica

Per le prove giudicate valide si procede al calcolo dell'attività antibatterica  $R$  usando la seguente equazione:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

Dove:

- $U_0$  è il logaritmo in base 10 della media delle cellule batteriche, espresse in cell/ml, rinvenute dal bianco a  $T_0$ ;
- $U_t$  è il logaritmo in base 10 della media delle cellule batteriche, espresse in cell/ml, rinvenute dal bianco al tempo di incubazione  $t$ ;
- $A_t$  è il logaritmo in base 10 della media delle cellule batteriche, espresse in cell/ml, rinvenute dal campione al tempo di incubazione  $t$ .

## Capitolo 3

# RISULTATI

Nel presente capitolo verranno illustrati i risultati analitici ottenuti. Tale presentazione si limita ad un'analisi statistica descrittiva a causa dell'esigua numerosità del campione.

### 3.1 E. coli – prima prova

Innanzitutto la prova è stata ritenuta valida in quanto soddisfacente i tre criteri di accettabilità (cfr 2.5.5):

- $(L_{max}-L_{min})/(L_{mean}) = 0,0179$
- $B_{T_0} = 9.380.000$
- $B_{T_2} = 15.780.000$

Per sintesi, di seguito Tabella 3.1 sono riportate solamente le medie delle conte ottenute dalle piastre rientranti nel range di accettabilità (cfr. 2.5.3), ma si ricorda che per ciascun campione sono state effettuate, in doppio, quattro diluizioni scalari.

Tabella 3.1: Medie delle conte ottenute dalla prima prova di inoculo di *E. coli*.

	B (cell/ml)	C1 (cell/ml)	C2 (cell/ml)
$T_0$	9.380.000	9.380.000	9.380.000
$T_1$	11.000.000	10.620.000	14.520.000
$T_2$	15.780.000	11.280.000	12.680.000

In questa prima prova la densità cellulare della sospensione batterica madre era di 2,7 McF (Tabella 2.1), poi diluita 1:100 prima dell'inoculo. Nelle prove successive si è deciso di abbassare il valore della sospensione

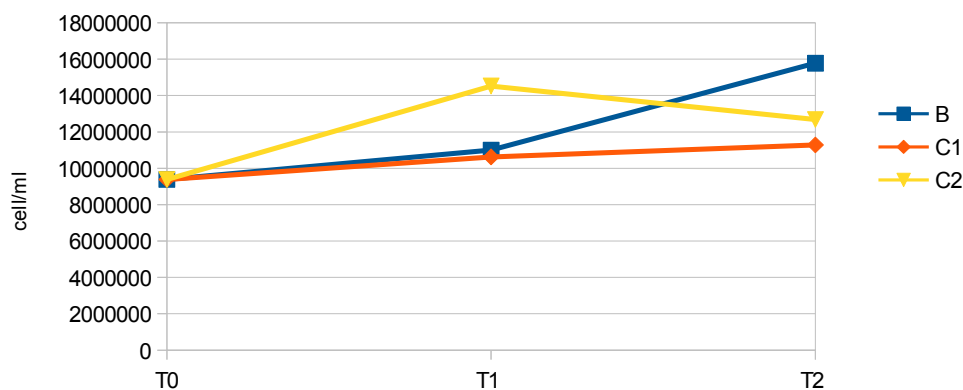


Figura 3.1: Andamento di *E. coli* durante la prima prova.

madre a circa 1 McF, in quanto le conte relative sia a C1 che C2 sono risultate estremamente elevate, anche alla diluizione più spinta ( $10^{-4}$ ). Questo fatto verrà discusso in seguito, ma si anticipa che sostanzialmente si può correlare alla scarsa attività esibita dai campioni.

Il grafico seguente, Figura 3.1 fa riferimento ai dati della precedente Tabella 3.1 e fornisce una visione d'insieme del comportamento di *E. coli* nei campioni test, C1 e C2, e nel bianco.

Nel grafico è possibile osservare come, al  $T_0$  (0h), si parta da una popolazione cellulare di circa 9.000.000 cell/ml. Ricordiamo che il bianco è unico, ma rappresentativo dell'inoculo effettuato in C1 e C2. Al  $T_1$  (4h) tutte le concentrazioni batteriche salgono al di sopra del bianco a  $T_0$ , e questo in maggior misura per C2. Al  $T_2$  (8h) si evince come la concentrazione di cellule batteriche sopravvissute sia inferiore nei campioni rispetto al bianco, ma pur superiore ai valori determinati al  $T_0$ . Per quantificare l'effettiva attività antibatterica R esibita da C1 e C2, sono state calcolate le differenze al  $T_1$  e al  $T_2$ , in scala logaritmica, Tabella 3.2, tra il *bianco* e ciascun campione, Tabella 3.3 e Tabella 3.2 .

Tabella 3.2: In questa tabella sono riportati i valori della densità cellulare di *E. coli* espressi in unità logaritmiche ( $Log_{10}$ ). Tali valori servono per calcolare l'attività antibatterica dei campioni (cfr. 2.6.6).

	B	C1	C2
$T_1$	7,04	7,03	7,16
$T_2$	7,20	7,05	7,10

Tabella 3.3: Attività batterica R dei due campioni, determinata per ciascun tempo di incubazione.

	R C1	R C2
$T_1$	0,02	-0,12
$T_2$	0,15	0,09

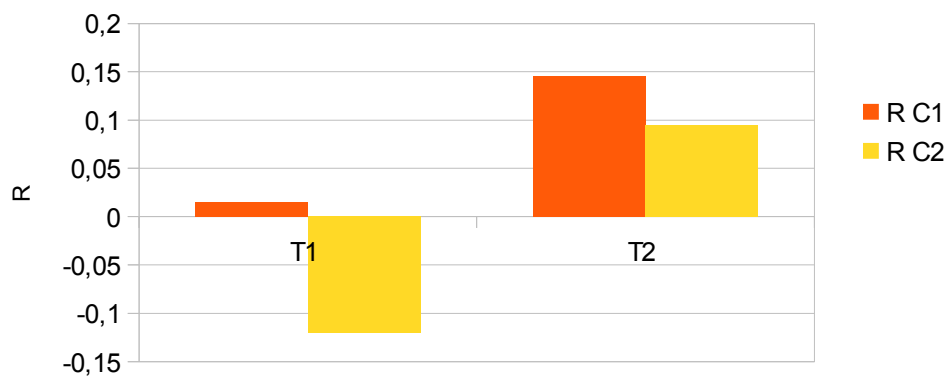


Figura 3.2: Rappresentazione grafica di R di entrambi i campioni.

Dal grafico notiamo che C2 ha un valore di R negativo a  $T_1$ , ciò significa che la densità di cellule batteriche in quest'ultimo è maggiore rispetto a quella del *bianco* registrata dopo lo stesso tempo d'incubazione. Il valore di R al  $T_2$  è, per entrambi i campioni, positiva, sebbene inferiore alle 0,15 unità logaritmiche.

### 3.2 S. aureus – prima prova

Anche questa prova è stata ritenuta valida in quanto soddisfacente i criteri di accettabilità (cfr. 2.5.5):

- $(L_{max} - L_{min}) / (L_{mean}) = 0,0005$
- $B_{T_0} = 2.910.000$
- $B_{T_2} = 517.500$

Di seguito, Tabella 3.4, sono riportate le medie delle conte ottenute dalle piastre rientranti nel range di accettabilità (cfr. 2.5.3).

Tabella 3.4: Medie delle conte ottenute dalla prima prova di inoculo di *S. aureus*.

	B (cell/ml)	C1 (cell/ml)	C2 (cell/ml)
$T_0$	2.910.000	2.910.000	2.910.000
$T_1$	815.000	825.000	1.015.000
$T_2$	517.500	880.000	400.000

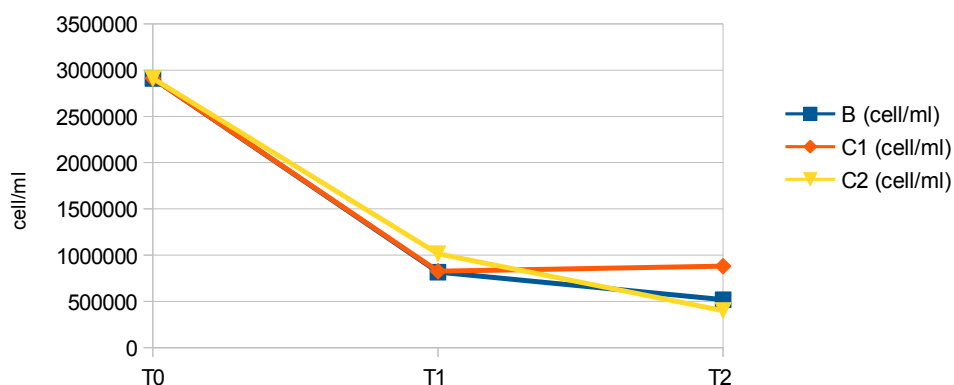


Figura 3.3: Andamento di *S. aureus* durante la prima prova.

Da tali dati e, coerentemente, dall'andamento del grafico sottostante Figura 3.3 si nota una sensibile e generalizzata diminuzione della densità cellulare in  $T_1$  e  $T_2$ . Tale calo, non imputabile all'effetto antibatterico del materiale in quanto verificatosi anche nel *bianco*, è imputabile a qualche condizione avversa evidentemente accusata dai microrganismi durante una delle fasi del protocollo analitico. Rispetto all'*E. Coli*, il ceppo *S. aureus* è di fatto colturalmente più delicato e quindi più suscettibile ad inibizioni della crescita della popolazione cellulare. La popolazione cellulare stimata al  $T_0$  è pari a circa 3.000.000 cell/ml. Come già accennato, al  $T_1$  la densità cellulare crolla bruscamente arrivando, per tutte e tre le curve, a circa 1.000.000 cell/ml. La situazione alle 8 ore ( $T_2$ ) non mostra una sensibile differenza fra i tre portamenti analizzati. L'assenza di efficacia microbica risulta ancora più chiara mostrando i risultati in termini di attività antibatterica Tabella 3.6: solo C2 dimostra di avere un'attività antibatterica positiva, sebbene anche in questo caso il valore sia di sole 0,11 unità logaritmiche. Il diagramma in Figura 3.4 rende graficamente evidente quello che è stato detto finora: in C1 i valori di R sono negativi sia a  $T_1$  che a  $T_2$ , mentre per C2 l'attività antibatterica al  $T_2$  è positiva, ma supera di poco le 0,1 unità logaritmiche.

Tabella 3.5: In questa tabella sono riportati i valori della densità cellulare di *S. aureus* espressi in unità logaritmiche ( $Log_{10}$ ). Tali valori servono per calcolare l'attività antibatterica dei campioni (cfr. 2.6.6).

	B	C1	C2
$T_1$	5,91	5,92	6,01
$T_2$	5,71	5,94	5,60

Tabella 3.6: Attività batterica R dei due campioni, determinata per ciascun tempo di incubazione.

	R C1	R C2
$T_1$	-0,01	-0,10
$T_2$	-0,23	0,11

### 3.3 *E. coli* – Seconda prova

La prova è stata ritenuta valida in quanto conforme con i criteri descritti in 2.5.5:

- $(L_{max}-L_{min})/(L_{mean}) = -0,0014$
- B  $T_0 = 1.735.000$
- B  $T_3 = 1.862.500$

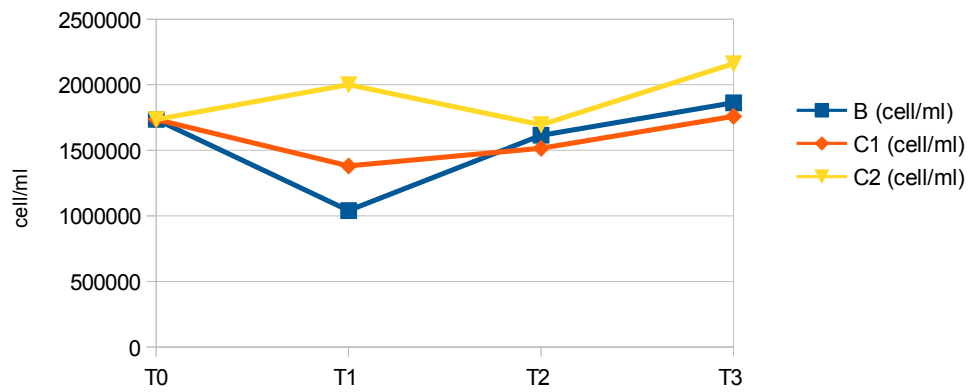
Si riportano le medie delle conte derivanti dalle piastre ricadenti nel range di accettabilità, Tabella 3.7. In seguito all'esecuzione della prima prova, esibente una mancata rilevazione di una attività antibatterica rilevante di C1 e C2 dopo 8 ore dall'inoculo, si è deciso di aggiungere un terzo tempo di incubazione  $T_3$  (24h).

Tabella 3.7: Medie delle conte ottenute dalla seconda prova di inoculo di *E. coli*.

	B (cell/ml)	C1 (cell/ml)	C2 (cell/ml)
$T_0$	1.735.000	1.735.000	1.735.000
$T_1$	1.040.000	1.380.000	2.000.000
$T_2$	1.614.634	1.515.000	1.695.000
$T_3$	1.862.500	1.760.000	2.160.000



Figura 3.4: Rappresentazione grafica di R di entrambi i campioni.

Figura 3.5: Andamento di *E. coli* durante la seconda prova.

Come si vede dal grafico Figura 3.5, a  $T_0$  la densità cellulare ammonta a circa 1.700.000 cell/ml; dopo 4 ore ( $T_1$ ) questo valore sale fino a circa 2.000.000 cell/ml per C2 mentre cala fino a 1.500.000 cell/ml per C1 e a 1.000.000 cell/ml per il bianco. La popolazione batterica ritorna ad essere simile per tutte e tre le curve al  $T_2$ , assestandosi nuovamente attorno alle 1.700.000 cell/ml. Anche dopo 24 ore dall'inoculo non si riscontra una marcata differenza di performance fra i tre portamenti: addirittura C2 esibisce una densità batterica più elevata rispetto al bianco.

C1 è l'unico campione a mostrare un'esigua attività antibatterica positiva in  $T_2$  e  $T_3$ , Tabella 3.9, e Figura 3.6.

Tabella 3.8: In questa tabella sono riportati i valori della densità cellulare di *E. coli* espressi in unità logaritmiche ( $Log_{10}$ ). Tali valori servono per calcolare l'attività antibatterica dei campioni (cfr. 2.6.6).

	B	C1	C2
$T_1$	6,02	6,14	6,30
$T_2$	6,21	6,18	6,23
$T_3$	6,27	6,25	6,33

Tabella 3.9: Attività batterica R dei due campioni, determinata per ciascun tempo di incubazione.

	R C1	R C2
$T_1$	-0,12	-0,28
$T_2$	0,03	-0,02
$T_3$	0,02	-0,06

Confrontando l'attività antibatterica di C1 e C2 fra la prima e la seconda prova Figura 3.7 e Figura 3.8 , possiamo fare le seguenti considerazioni:

- Dopo 4 ore ( $T_1$ ) dall'inoculo l'attività antibatterica di C1 era appena positiva nella prima prova mentre nella seconda il valore di R è pari a - 0,12. A  $T_2$  i valori di R sono entrambi positivi, ma nella prima prova si arriva a toccare lo 0,15 contro lo 0,02 registrato nella seconda;
- Per quanto riguarda C2, contrariamente a quanto rilevato nella prima prova, in  $T_2$  il valore di R è negativo.

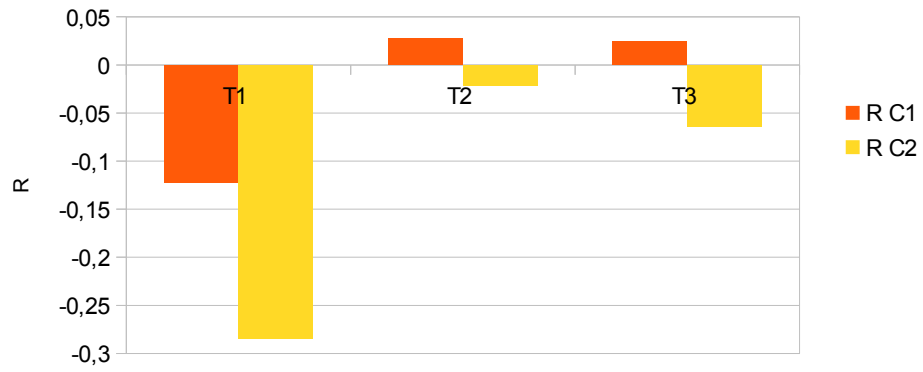


Figura 3.6: Rappresentazione grafica di R di entrambi i campioni.

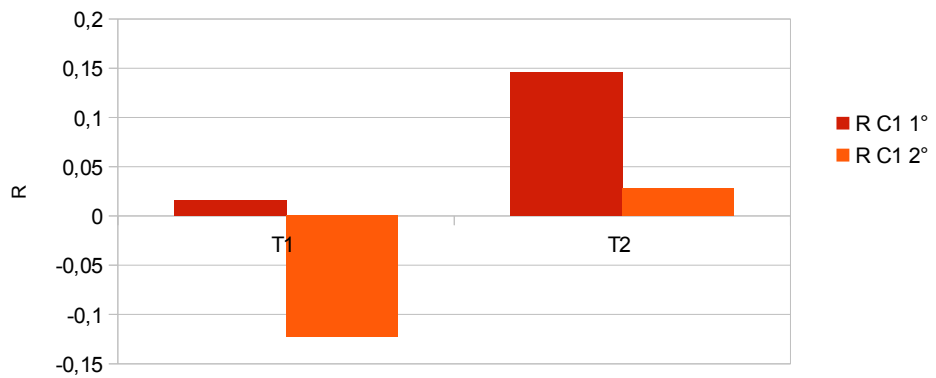


Figura 3.7: Confronto fra i valori di R di C1 ottenuti nella prima e nella seconda prova con *E. coli*.

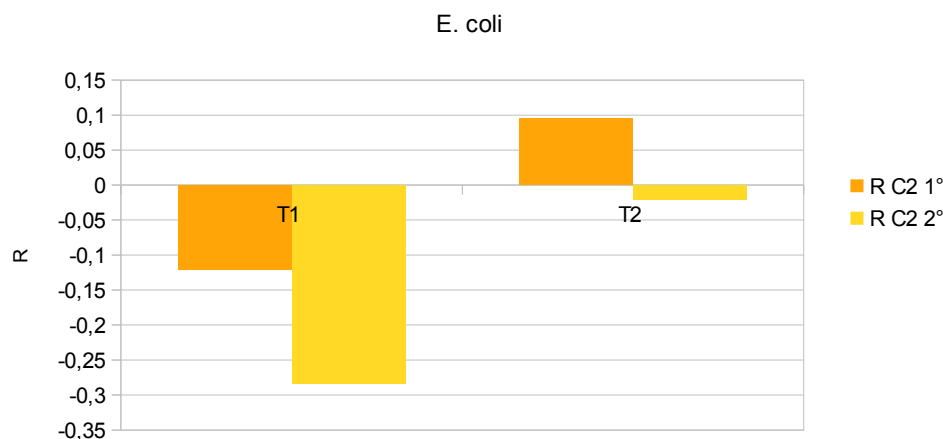


Figura 3.8: Confronto fra i valori di R di C2 ottenuti nella prima e nella seconda prova con *E. coli*.

### 3.4 S. aureus – seconda prova

La prova è stata ritenuta valida in quanto conforme ai criteri di accettabilità:

- $(L_{max}-L_{min})/(L_{mean}) = 0,0066$
- $B T_0 = 2.550.000$
- $B T_3 = 1.635.000$

In Tabella 3.10 sono riportate le medie delle conte effettuate sulle piastre rientranti nell'ideale range numerico (cfr. 2.5.3).

Tabella 3.10: Medie delle conte ottenute dalla seconda prova di inoculo di *S. aureus*.

	B (cell/ml)	C1 (cell/ml)	C2 (cell/ml)
$T_0$	2.550.000	2.550.000	2.550.000
$T_1$	2.415.000	2.555.000	2.515.000
$T_2$	2.205.000	2.245.000	2.175.000
$T_3$	1.635.000	1.095.000	1.550.000

Contrariamente a quanto avvenuto in precedenza, in questa prova i microrganismi non sembrano aver incontrato condizioni colturali sfavorevoli, nonostante tutte e tre le curve di crescita Figura 3.9 decrescano progressivamente nel tempo. A  $T_0$  si registra una densità cellulare di 2.550.000

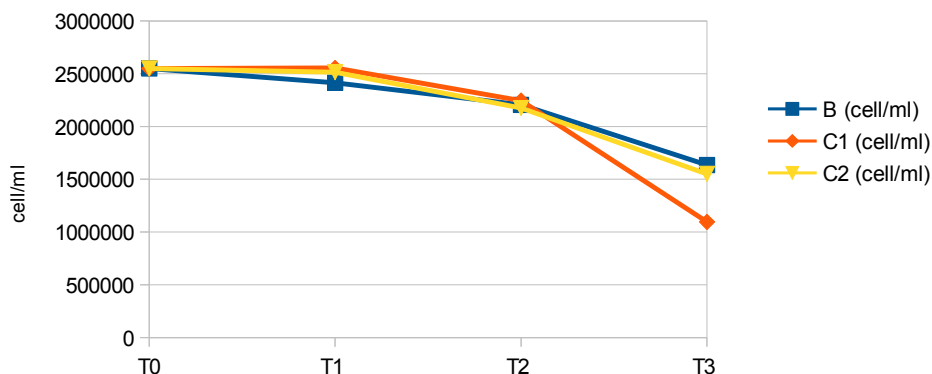


Figura 3.9: Andamento di *S. aureus* durante la seconda prova.

cell/ml: tale numerosità rimane stabile anche al  $T_1$  per tutti e tre i tipi di portanti. La concentrazione cala poi uniformemente fino ad un valore di circa 2.200.000 cell/ml in  $T_2$ , dove la differenza tra i campioni C1 e C2 ed il *bianco* risulta minimale. In  $T_3$  entrambe le curve dei campioni appaiono leggermente inferiori rispetto al bianco, nel quale è stata registrata una densità batterica di circa 1.500.000 cell/ml. Si può sostenere che, dopo 24 ore, si riscontra un'attività antibatterica maggiore per C1 rispetto a C2, ma che i valori di R si discostano di poco dallo 0 (attività nulla), Tabella 3.12 e Tabella 3.10.

Tabella 3.11: In questa tabella sono riportati i valori della densità cellulare di *S. aureus* espressi in unità logaritmiche ( $\text{Log}_{10}$ ). Tali valori servono per calcolare l'attività antibatterica dei campioni (cfr. 2.6.6).

	B	C1	C2
$T_1$	6,38	6,41	6,40
$T_2$	6,34	6,35	6,34
$T_3$	6,21	6,04	6,19

Tabella 3.12: Attività batterica R dei due campioni, determinata per ciascun tempo di incubazione.

	R C1	R C2
$T_1$	-0,02	-0,02
$T_2$	-0,01	0,01
$T_3$	0,17	0,02

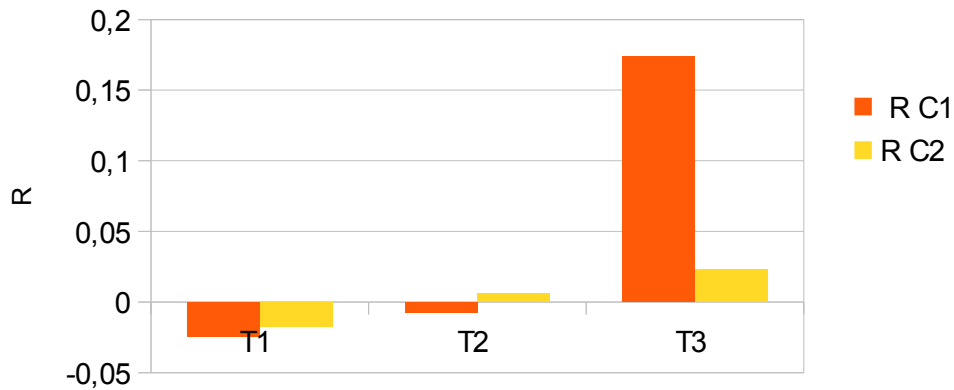


Figura 3.10: Rappresentazione grafica di R di entrambi i campioni.

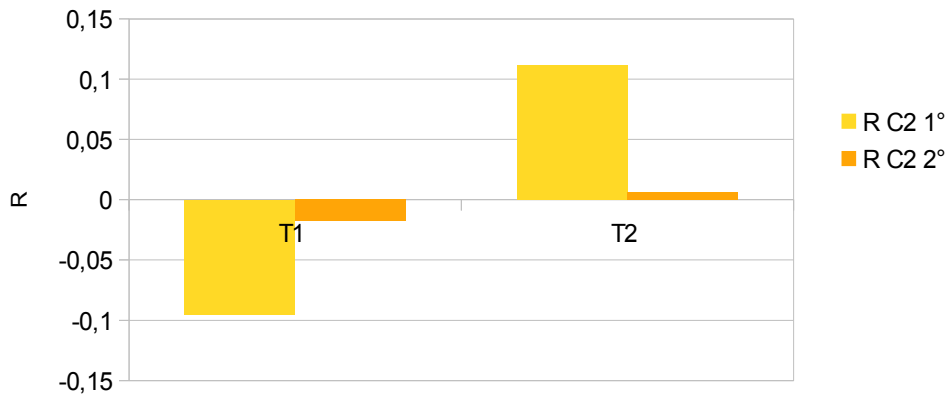


Figura 3.11: Confronto fra i valori di R di C1 ottenuti nella prima e nella seconda prova con *S. aureus*.

I grafici sottostanti Figura 3.11 Figura 3.12 confrontano le performance di C1 e C2 fra la prima e la seconda prova:

- I valori di R per C1 rimangono negativi sia in  $T_1$  (4h) che in  $T_2$  (8h), ma in quest'ultimo tempo l'attività antibatterica negativa è più elevata nella prima prova che nella seconda, forse a causa delle condizioni verificatesi in precedenza;
- Per quanto riguarda C2, al  $T_2$  (8h) l'attività antibatterica R è positiva in  $T_2$  in entrambe le prove, ma nella prima questa ammonta a circa 0,1, mentre nella seconda è prossima allo 0.

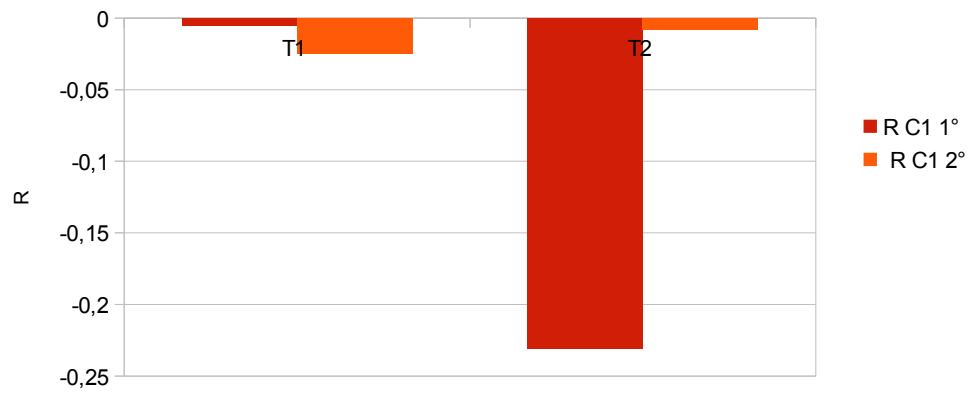


Figura 3.12: Confronto fra i valori di R di C2 ottenuti nella prima e nella seconda prova con *S. aureus*.

## Capitolo 4

# DISCUSSIONE

In assenza di una scala numerica in grado di quantificare l'attività antibatterica  $R$  dei due campioni testati, i risultati ottenuti possono apparire confusi e contrastanti. Sta di fatto che la determinazione di valori di  $R$  negativi o comunque prossimi allo zero, è in realtà indice di un mancato effetto microbicide dei materiali. Le differenze tra i campioni C1 e C2 ed il *bianco*, quando positive, si limitano infatti a scarti di decimi di unità logaritmiche.

L'ISO 22196:2011(E), utilizzata come riferimento per il design sperimentale del presente lavoro pilota, non fornisce un valore soglia dell'attività antibatterica che decreti se il materiale testato sia realmente efficace contro la contaminazione batterica. Per cercare di ovviare a questa mancanza di un termine di paragone, si è dunque andati a considerare la normativa JIS Z 2801:2000, precedente l'ISO 22196:2011(E), dal titolo "*Antimicrobial products-Test for antimicrobial activity and efficacy*" [25]. Tale standard stabilisce che l'attività antibatterica di un materiale è rilevante qualora sia maggiore o uguale a 2,0.

Non sapendo se il valore soglia determinato dalla normativa JIS Z 2801:2000 rispecchiasse gli standard richiesti in ambito contattologico, si è presa in considerazione l'ISO 14729:2010, recante "*Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses*"[26]. La suddetta ISO, dedicata prevalentemente alle soluzioni, stabilisce due requisiti che una soluzione disinfettante per lenti a contatto deve soddisfare per poter ottenere la certificazione:

- *Primo criterio o Stand alone Test*: per quanto riguarda l'attività battericida contro una determinata specie, essa stabilisce che la densità batterica, espressa in cell/ml, dev'essere ridotta, nel tempo di contatto stabilito, per un valore medio non inferiore al 99,9%, ovvero alle 3,0 unità logaritmiche;
- *Secondo criterio o Regimen Test*: se la soluzione non supera il primo criterio allora deve garantire una riduzione media complessiva di alme-

no 5,0 unità logaritmiche per 3 diverse specie batteriche. A tal proposito la normativa considera *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*.

Paragonando i requisiti di tali criteri con i risultati ottenuti dalle prove si può affermare che, anche solo considerando le attività antibatteriche positive determinate nel corso dell quattro prove, queste non sarebbero sufficienti per passare il test di certificazione, nemmeno dopo 24 ore di immersione della lente.

E' possibile comparare i risultati qui ottenuti anche con quelli riportati nell'articolo citato all'inizio del secondo capitolo[24] che, fra i vari portamenti testati, ha utilizzato uno dei due prodotti vagliati in questo lavoro.

L'autore effettua una sola prova per ogni microrganismo quindi si ritiene che per un corretto termine di confronto, si debbano prendere in considerazione i risultati ottenuti dalla prima prova in  $T_2$  e quelli riportati nell'articolo ottenuti fra le 6 ore e le 10 ore dall'inoculo a concentrazione dell'ordine di  $10^6$  cell/ml:

- Contro *S. aureus* anche in tale studio l'attività antibatterica del portamenti rimane di gran lunga inferiore all'unità (circa 0,1);
- Contro *P. aeruginosa*, un batterio Gram negativo come *E. coli*, il portamenti continua a mostrare attività esigue come nella nostra tesi.

Interessante è notare che, coerentemente, anche tutti gli altri campioni, ovvero portamenti cedenti ioni argento, presi in esame dopo circa 8 ore dall'inoculo, non raggiungono la differenza di 1 unità logaritmica tra bianco e campione con nessun microrganismo testato e solo uno soddisfa i requisiti dell'ISO 14729 dopo 24 ore dall'inoculo di tutti i batteri tranne che *S. aureus*.

## Capitolo 5

# CONCLUSIONI

In conclusione, visti i risultati delle prove eseguite e il confronto con la letteratura, l'attività antibatterica esibita dai portamenti C1 e C2 con ioni argento addizionati, attualmente in commercio, è pressoché irrilevante. L'utilizzo di tali portamenti appare dunque del tutto insufficiente a supplire e/o a coadiuvare l'attività battericida delle soluzioni disinfettanti. Pur tuttavia va ricordato che la concentrazione dell'argento nella mescola plastica di C1 e C2 non è stata resa nota: essa potrebbe dunque risultare semplicemente troppo bassa per produrre un effetto sensibile.

Nonostante i risultati ottenuti con il presente lavoro pilota, pertanto, si incoraggia l'esecuzione di ulteriori ricerche volte al perfezionamento dell'impiego dell'argento in campo contattologico, soprattutto considerando gli indiscussi benefici che il suo utilizzo ha già addotto in ambito medico-sanitario (cfr. 1.6). La ricerca dovrebbe pertanto concentrarsi sull'individuazione della concentrazione di ioni argento ottimale per il raggiungimento di livelli di attività antibatterica in grado di soddisfare i requisiti normativi, o quantomeno avvicinarvisi in modo da poter impiegare i portamenti come coadiuvanti dell'attività delle MPSs, le quali potrebbero essere rese meno aggressive e quindi meno soggette ad essere fonte di reazioni allergiche e/o tossiche per gli occhi dei portatori, Figura 5.1. Un'ipotesi da vagliare potrebbe essere quella di rivestire interamente le coppette dei portamenti con un sottile strato d'argento, o ancora di realizzarlo non in materiale plastico, ma con del laminato metallico. Sicuramente un prodotto del genere avrebbe un costo di mercato superiore a quello del classico portamenti in plastica: il target delle prove dovrebbe contemplare una comprovata efficacia anche in caso di un impiego prolungato del contenitore, ovvero superiore al mese, periodo che viene consigliato per i portamenti attualmente sul mercato.

Quest'ultima considerazione rappresenta, per altro, uno spunto di riflessione, per così dire, interdisciplinare: essa porta a riflettere sulla quantità di portamenti che vengono buttati fra i rifiuti ogni mese.

Si stima che nel mondo ci siano 125 milioni di portatori di lenti a

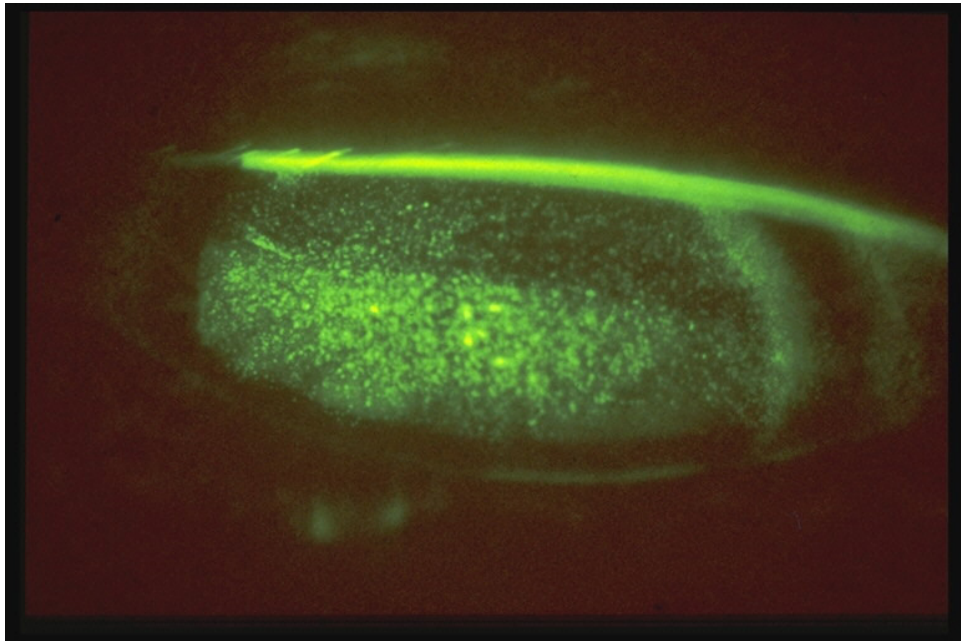


Figura 5.1: In questo caso la punteggiatura corneale, evidenziata tramite l'uso di fluoresceina, è segno di erosione epiteliale dovuta a una reazione tossica. Immagine tratta da: <http://www.bausch.co.za/en-za/ecp/for-your-practice/resource-materials/clinical-photos/epithelium/>.

contatto[27], ciò vuol dire che ogni mese ci sono 125 milioni di portalentini che finiscono nell'immondizia. Ogni portalenti pesa circa 10 g, quindi in un mese si producono 1.250 tonnellate di plastica, 15.000 tonnellate in un anno. Da un punto di vista prettamente ecologico, sarebbe pertanto utile lo sviluppo di un portalenti in grado di essere utilizzato per periodi più lunghi, senza però inficiare la sicurezza igienica delle lenti.

Oltre alla tipologia di materiale, si dovrebbe considerare con maggior attenzione il design stesso dell'oggetto: costruire i portalenti con materiali non porosi e, soprattutto, senza la presenza di scanalature o rilievi all'interno della coppetta, consentirebbe una più facile pulizia del portalenti e, in primis, rimozione dell'eventuale biofilm.

In conclusione rimane assolutamente viva la raccomandazione di adottare uno scrupoloso regime di igiene del portalenti, nonché personale, per evitare che l'uso delle lenti a contatto diventi fonte di rischi per la salute oculare che potrebbero compromettere seriamente e in modo permanente la visione.



# Bibliografia

- [1] L. Lupelli, R. Fletcher, and A. Rossi., *Contattologia. Una guida clinica. II edizione.* Medical Books, Palermo, 2004.
- [2] L. Szczotka-Flynn, D. G. Ahearn, J. Barr, W. J. Benjamin, T. Kiang, J. J. Nichols, O. D. Schein, R. P. Stone, and L. Winterton, *1. History, evolution, and evolving standards of contact lens care*, Contact Lens and Anterior Eye**36** 2014/09/06S4–S8.  
[http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484\(13\)60003-X/abstract](http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484(13)60003-X/abstract).
- [3] J. P. Shovlin, P. Argüeso, N. Carnt, R. L. Chalmers, N. Efron, S. M. J. Fleiszig, J. J. Nichols, K. A. Polse, F. Stapleton, L. Wiley, M. Willcox, F. V. Bright, L. W. Jones, N. Keir, and R. C. Peterson, *3. Ocular surface health with contact lens wear*, Contact Lens and Anterior Eye**36** 2014/09/06S14–S21.  
[http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484\(13\)60005-3/abstract](http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484(13)60005-3/abstract).
- [4] A. Rossetti and P. Gheller., *Manuale di optometria e contattologia. II edizione.* Zanichelli, 2003.
- [5] P. B. Morgan, F. V. Bright, S. E. Burke, R. L. Chalmers, C. Dobson, S. M. J. Fleiszig, J. C. Hutter, E. Papas, R. C. Peterson, and F. Stapleton, *4. Contemporary research in contact lens care*, Contact Lens and Anterior Eye**36** 2014/09/06S22–S27.  
[http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484\(13\)60006-5/abstract](http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484(13)60006-5/abstract).
- [6] N. Efron, N. A. Brennan, F. V. Bright, B. J. Glasgow, L. W. Jones, D. A. Sullivan, A. Tomlinson, and J. Zhang, *2. Contact lens care and ocular surface homeostasis*, Contact Lens and Anterior Eye**36** 2014/09/06S9–S13.  
[http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484\(13\)60004-1/abstract](http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484(13)60004-1/abstract).
- [7] A. E. Aiello, J. Cimiotti, P. Della-Latta, and E. L. Larson, *A comparison of the bacteria found on the hands of 'homemakers' and*

- neonatal intensive care unit nurses*, *The Journal of hospital infection* **54** no. 4, (2003) 310–315.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670103001464?showall=true>.
- [8] J. Anderson, I. Davies, A. Kruse, T. Løfstrøm, and L. Ringmann, *Manuale per l'assistenza all'applicazione di Lenti a Contatto. 2a edizione*. The vision care institute of Johnson&Johnson Medical s.p.a., 2009.
- [9] M. Willcox, N. Harmis, B. Cowell, T. Williams, and B. Holden, *Bacterial interactions with contact lenses; effects of lens material, lens wear and microbial physiology*, *Biomaterials* **22** no. 24, (2001) 3235 – 3247.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961201001612>.  
Ophthalmic Special Issue.
- [10] M. E. Zegans, R. M. Q. Shanks, and G. A. O'toole, *Bacterial Biofilms and Ocular Infections*, *The Ocular Surface* **3** no. 2, 2014/09/0673–80.  
[http://www.theocularsurfacejournal.com/article/S1542-0124\(12\)70155-6/abstract](http://www.theocularsurfacejournal.com/article/S1542-0124(12)70155-6/abstract).
- [11] R. Donlan and J. Costerton, *Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms.*, *Clinical microbiology reviews* **15** no. 2, (2002) 93–167.
- [12] L. Drago, S. Ripa, C. Zampaloni, E. D. Vecchi, L. Vitali, D. Petrelli, and M. Prenna, *Activity of Ceftributen, Cefaclor, Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin and Telithromycin against Streptococcus pyogenes Clinical Isolates with Different Genotypes and Phenotypes*, 2004. <http://www.karger.com/Article/Abstract/87254>.
- [13] L. Selan, S. Palma, G. L. Scoarughi, R. Papa, R. Veeh, D. Di Clemente, and M. Artini, *Phosphorylcholine Impairs Susceptibility to Biofilm Formation of Hydrogel Contact Lenses*, *American Journal of Ophthalmology* **147** no. 1, 2014/09/06134–139.  
[http://www.ajo.com/article/S0002-9394\(08\)00584-9/abstract](http://www.ajo.com/article/S0002-9394(08)00584-9/abstract).
- [14] E. Midena, *Malattie dell'apparato visivo*. CEDAM, Padova, 2006.
- [15] M. D.P. Willcox, E. B.H. Hume, A. K. Vijay, and R. Petcavich, *Ability of silver-impregnated contact lenses to control microbial growth and colonisation*, *Journal of Optometry* **03** no. 310, (2010).  
<http://www.journalofoptometry.org/en/ability-of-silver-impregnated-contact-lenses/articulo/13156181/>.
- [16] J. Kanski and B. Bowling., *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach. VII edizione*. Saunders, 2011.

- [17] L. Santos, R. Oliveira, M. E. C. R. Oliveira, and J. Azeredo, *Lens material and formulation of multipurpose solutions affects contact lens disinfection*, *Contact Lens and Anterior Eye* **34** no. 4, (2011) 179 – 182.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367048411000075>.
- [18] T. Kuzman, M. B. Kutija, J. Juri, S. Jandroković, I. Škegro, S. M. Olujić, R. Kordić, and B. Cerovski, *Lens wearers non-compliance—Is there an association with lens case contamination?*, *Contact Lens and Anterior Eye* **37** no. 2, (2014) 99 – 105.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367048413001161>.
- [19] J. V. Cabrera and J. B. Rodriguez, *Ocular bacterial flora in contact lens wearers*, *International Contact Lens Clinic* **23** no. 4, (1996) 149 – 151.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0892896796000648>.
- [20] J. W. Alexander, *History of the Medical Use of Silver*, *Surgical Infections* **10** no. 3, (2009).
- [21] B. S. Fazly Bazzaz, B. Khameneh, M.-m. Jalili-Behabadi, B. Malaekheh-Nikouei, and S. A. Mohajeri, *Preparation, characterization and antimicrobial study of a hydrogel (soft contact lens) material impregnated with silver nanoparticles*, *Contact Lens and Anterior Eye* **37** no. 3, 2014/09/06149–152.  
[http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484\(13\)00278-6/abstract](http://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484(13)00278-6/abstract).
- [22] C. F. Amos and M. D. George, *Clinical and laboratory testing of a silver-impregnated lens case*, *Contact Lens and Anterior Eye* **29** no. 5, (2006) 247 – 255.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367048406001329>.
- [23] ISO 22196:2011(E), *Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*.
- [24] J. Dantam, H. Zhu, and F. Stapleton, *Biocidal efficacy of silver-impregnated contact lens storage cases in vitro*, *Investigative ophthalmology and visual science*. **52** no. 1, (2011).
- [25] JIS Z 2801:2000, *Antimicrobial products-Test for antimicrobial activity and efficacy*.
- [26] ISO 14729:2010, *Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses*.
- [27] J. Rumpakis, *New data on contact lens dropout: an international perspective.*, January, 2010.  
[http://www.revoptom.com/content/d/contact\\_lenses\\_and\\_solutions/c/18929/](http://www.revoptom.com/content/d/contact_lenses_and_solutions/c/18929/).