

Valutazione della contaminazione microbica spontanea dopo prima apertura di preparati oftalmici

Evaluation of spontaneous contamination of ocular medications after first opening

Giornale Italiano di
Microbiologia Medica
Odontoiatrica e Clinica
Vol. IV, N° 2, 2000
p. 93 - 102

Copyright © 2000

**A. Marchese¹,
E.A. Debbia¹,
G.C. Schito¹**

*Autore di riferimento:
E.A. Debbia

Riassunto. Il rischio di contaminazione ambientale per preparazioni sterili dopo prima apertura non può essere escluso completamente. Nel caso di preparati oftalmici monodose, riutilizzabili entro 12 ore, tale rischio è maggiore considerando il possibile contatto con le superfici oculari dei pazienti. Per valutare tale problematica, sono state aperte 5 confezioni per ciascuno degli 8 colliri studiati e contenenti rispettivamente, come principi attivi, timololo, tetrizolina-feniramina, diclofenac, ketotifene, acido ialuronico, formocortal, formocortal-gentamicina e pilocarpina. I preparati sono rimasti esposti per un periodo di 24 ore. Dopo 0, 2, 4, 8 e 24 ore aliquote di soluzione (10 µl) sono state piastrate su agar-sangue di montone, Mc Conkey e Sabouraud ed incubate per 48 ore. Per analizzare l'evoluzione nel tempo di una popolazione microbica introdotta artificialmente nei medicinali, simulando un possibile inquinamento per contatto con lesioni oculari, sono state allestite sospensioni (10⁵ CFU) dei microorganismi più frequentemente ritrovati nella popolazione microbica oculare e suoi annessi: *S.aureus*, *S.epidermidis*, Stafilococchi coagulasi negativi, *S.pneumoniae*, *Streptococcus* spp, *Corynebacterium* spp, *P.aeruginosa*, *Neisseria* spp, *Acinetobacter* spp, *H.influenzae*, *E.coli*, *C.albicans*. Almeno 3 confezioni per ogni prodotto sono state infettate con tali sospensioni ed incubate a temperatura ambiente e a 35°C. Dopo 0, 2, 4, 8 e 24 ore quantità note (10 µl) sono state insemenate su terreno ottimale per lo sviluppo di ciascun microorganismo. I dati ottenuti dimostrano che anche dopo 24 ore di apertura delle singole confezioni mantenute esposte, non si è registrato alcun tipo di inquinamento spontaneo, sia di natura microbica che di natura fungina. Le varie soluzioni medicamentose hanno rivelato attività batteriostatica o battericida in ragione della specie batterica considerata (la carica batterica introdotta non è variata sensibilmente nelle 24 ore), tuttavia, i medicinali contenenti tetrizolina feniramina, ketotifene, formocortal-gentamicina e pilocarpina hanno svolto attività battericida nei confronti di tutti i patogeni. Ulteriori dati dimostrano che la plastica utilizzata per fabbricare i contenitori non favorisce l'adesività alla loro superficie interna dei microorganismi presi in esame. I risultati ottenuti suggeriscono un prolungamento del tempo di utilizzo dopo prima apertura dei preparati oftalmici studiati.

Summary. In order to evaluate whether ophthalmic preparations can be used within 24 hours after first opening, eight different sterile ocular medications containing timolol, hyaluronic acid, diclofenac, ketotifen, pilocarpine, formocortal, formocortal-gentamycin, and tetryzoline-feniramine, were opened and tested for spontaneous bacterial contamination after exposure to air. Samples (10 µl) were collected from 3 containers of each ophthalmic preparation after 0, 2, 4, 8 and 24 hours. No viable microorganisms were detected during and at the end of the evaluation time. In order to assess if the ocular bacterial population in health and diseases might contaminate the medications, about 10⁵ cells of different resident species (*S.aureus*, coagulase-negative staphylococci, *S.pneumoniae*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *P.aeruginosa*, *Neisseria* spp., *Acinetobacter* spp, *H.influenzae*, *E.coli* and *C.albicans*) were added to the containers and incubated at 37°C or at room temperature. Samples were collected and the number of viable bacteria was estimated. The medicaments showed a bacteriostatic effect depending of the species considered with tetryzoline-feniramine, pilocarpine, ketotifen and formocortal-gentamycin exhibiting bactericidal activity (<100 survivors after 18-24 h of exposure) against the majority of all relevant species. These data indicate that the risk of spontaneous contamination of containers after first opening is low, and that all compounds exhibit antibacterial activity. These results suggest that a safe usage of these ocular medications can be extended from the recommended 12 hours at least 24 hours after first opening.

¹Istituto di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Genova.

Marchese, Debbia
e Schito

INTRODUZIONE

L'occhio come tutte le superfici degli organi a contatto con l'ambiente esterno è naturalmente colonizzato da varie specie batteriche (O'Brien and Green, 1995a e 1995b). Al pari di quanto avviene nella cavità orale, l'ecosistema oculare è composto da microorganismi residenti abituali e transitori, adesi alla congiuntiva e organizzati in microcolonie. Questo fenomeno implica la presenza di un biofilm, in cui sono immersi i batteri, costituito da polisaccaridi e prodotti metabolici che mediano adesività tra i microorganismi e gli epitelii e tra i batteri stessi. Anche in questo caso, come per la cavità orale, l'attività dei macrofagi e degli antibiotici è possibile solo sulle forme planctoniche (Costerton *et al.*, 1994; Darveau *et al.*, 1997; Costerton *et al.* 1999).

Anche se nello sviluppo di un'infezione della cavità oculare entrano in gioco molti fattori, non ultimo lo stato di salute dell'individuo, la presenza di lenti a contatto aumenta il rischio dell'insorgenza di un processo infettivo (Cheng *et al.*, 1999). Ciò è dovuto alle frequenti manipolazioni, alla facile contaminazione del contenitore e alla propensione che hanno i batteri di aderire alle lenti. Anche in questo caso i microorganismi si organizzano in un biofilm. La terapia della maggior parte delle patologie della cavità oculare si esegue mediante farmaci ad uso topico, che per le ragioni appena esposte, presentano un certo rischio di contaminazione microbica. Appare perciò estremamente importante prevenire l'inquinamento batterico dei preparati e conoscerne l'incidenza specie per quelle soluzioni che non possiedono specifici agenti antimicrobici.

Per ciò che concerne i preparati sterili il tempo di conservazione dopo la prima apertura proposto dalla European Agency for the Evaluation of Medicinal Product deve essere di circa tre ore. Tale limite è stato fissato tenendo conto di una possibile contaminazione ambientale e del conseguente sviluppo nei preparati di potenziali patogeni. Nel ca-

so di soluzioni oftalmiche in contenitori da 0,5 ml monodose, riutilizzabili entro 12 ore, come già accennato, tale rischio è maggiore considerando il possibile contatto delle confezioni aperte con le superfici oculari dei pazienti, sulle quali i microorganismi opportunisti o patogeni presenti possono venire introdotti (Høding e Sjørusen, 1982; Schein *et al.*, 1992). In funzione della natura dei preparati farmaceutici a questa contaminazione possono seguire eventi diversi. Il numero di batteri potrà aumentare in modo considerevole se il fluido ha capacità nutrienti, rimanere invariato se non contiene sostanze utilizzabili, volgere nuovamente alla sterilità se dotato di proprietà antimicrobiche. Esiste infine la possibilità che una certa quantità di batteri, derivati da una contaminazione o da un contatto con superfici oculari possa essere sequestrata dal liquido a causa del verificarsi di fenomeni di adesività sulla parete di plastica del contenitore. In tal caso potrebbe risultare non più disponibile come inoculo se il preparato oftalmico viene riutilizzato. D'altra parte, la semplice adesione ad una superficie attiva nel microorganismo l'espressione di molti geni che esaltano la sintesi sia di composti necessari alla vita sessile sia di quelli che sono coinvolti nei meccanismi di patogenicità e virulenza. I germi adesi potrebbero pertanto rappresentare una sorgente costante di microorganismi virulenti (Davis *et al.*, 1993; Costerton *et al.*, 1999).

Per verificare tutte queste ipotesi si è proceduto ad un'analisi sperimentale della contaminazione spontanea di otto soluzioni oftalmiche ad uso topico i cui principi attivi non presentano attività antibatterica intrinseca, fatta eccezione per un solo composto che include gentamicina. Lo studio ha inoltre esaminato il destino di quantità note di diverse specie batteriche immesse nel preparato oftalmico allo scopo di simulare una contaminazione da contatto con la congiuntiva infetta e la capacità del contenitore di plastica di fornire un substrato per l'adesività di alcune specie di stafilococchi.

MATERIALI E METODI

Microorganismi

Gli stipiti utilizzati in questo studio sono stati isolati da materiale patologico. Nella collezione sono stati inclusi: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Neisseria* spp., *H. influenzae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Candida albicans*.

Terreni di coltura

S. aureus, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. ed *E. coli*, sono stati coltivati in Mueller-Hinton Broth (Difco) che all'occorrenza è stato solidificato con agar-agar come suggerito da NCCLS (1997). Allo stesso terreno veniva addizionato il 5% di sangue lisato di montone per la coltivazione di *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. I batteri gram-negativi, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e *Acinetobacter* spp. sono stati inoltre isolati in McConkey agar. Il terreno HTM (Haemophilus Test Medium) è stato impiegato per *H. influenzae*, mentre agar-cioccolato è stato utilizzato per *Neisseria* spp. e, infine, per i miceti è stato adottato il terreno Sabouraud agar.

Valutazione della contaminazione spontanea dei colliri

Tutte le confezioni di colliri studiate ed i contenitori vuoti sono stati forniti dalla ditta Farmigea Spa, Pisa.

La valutazione di una contaminazione spontanea dei colliri è stata effettuata utilizzando cinque confezioni per ciascun prodotto (timololo, tetrizolina-feniramina, diclofenac, ketotifene, acido ialuronico, formocortal, formocortal-gentamicina e policarpina). I campioni sono stati aperti e mantenuti in tali condizioni per 24 ore a temperatura ambiente.

Ai tempi 0, 2, 4, 8 e 24 ore, aliquote note dei prodotti, pari a 10 µl, sono state piastrate su agar-sangue di montone, agar McConkey e agar Sabouraud ed incubate per 48 ore a 37°C. Passato tale periodo le piastre sono state esaminate per verificare l'eventuale crescita dei microorganismi. I tre diversi terreni sono stati utilizzati perché adatti

allo sviluppo o alla selezione rispettivamente per gram-positivi, gram-negativi e miceti.

Controllo della crescita batterica utilizzando come terreno di coltura il preparato oftalmico

L'evoluzione nel tempo della popolazione microbica, introdotta nei medicinali, al fine di mimare un possibile inquinamento per contatto con le superfici oculari infette, è stata studiata allestendo sospensioni batteriche delle varie specie in soluzione fisiologica alla concentrazione di 10⁵ CFU/ml. La scelta di tale carica è derivata da considerazioni fisiopatologiche relative alla densità dei patogeni che possono colonizzare la regione oculare e produrre infezione.

Tre confezioni di ogni prodotto sono state insemenate con tali sospensioni ed incubate a temperatura ambiente e a 35° C. Dopo 0, 2, 4, 8 e 24 ore, quantità note 10 µl di ciascuna soluzione sono state seminate su terreno ottimale per lo sviluppo di ciascun microorganismo. Le piastre sono state così poste ad incubare in termostato a 37° C per 24 ore, trascorse le quali si è proceduto a contare le unità formanti colonia (CFU) per ogni piastra e disegnare così la curva di crescita.

Valutazione dell'adesività alla plastica del contenitore delle diverse specie batteriche

Si è operato con modalità analoghe a quelle sopra descritte e utilizzando le stesse sospensioni batteriche in soluzione fisiologica (10⁵ CFU). Due gruppi di contenitori per colliri da 0,5 ml in plastica, vuoti, forniti da Farmigea Spa sono stati inoculati e incubati sia a temperatura ambiente sia a 35°C. Una porzione delle cellule è stata utilizzata come controllo disponendola in doppio in contenitori di vetro. Dopo 0, 2, 4, 8 e 24 ore, quantità note 10 µl di ciascuna sospensione sono state distribuite su terreno ottimale per lo sviluppo di ciascun microorganismo. Le piastre sono state quindi incubate in termostato a 37° C per 24 ore, trascorse le quali si è proceduto a contare le CFU.

Contaminazione spontanea di preparati oftalmici

Spontaneous contamination of ocular medications

Marchese, Debbia
e Schito

Tabella I

Valutazione della contaminazione spontanea dei preparati aperti e mantenuti a temperatura ambiente per il tempo indicato.

Tempo (ore)	Timololo	Acido Jaluronico	Diclofenac	Ketotifene	Tetrizolina-feniramina	Policarpina	Formocortal	Formocortal-gentamicina
0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-

- assenza di microorganismi.

- Sono stati utilizzati 5 campioni diversi per ogni preparato.

RISULTATI

Valutazione della contaminazione spontanea dei colliri

La Tabella I riporta i dati ottenuti con cinque campioni diversi dei preparati mantenuti aperti e privi di cappuccio di chiusura conservati a temperatura ambiente per 24 ore. Nessuna confezione, in tali condizioni, ha evidenziato contaminazione batterica o fungina, né ai vari tempi in cui sono stati effettuati i prelievi, né al termine della prova dopo 24 ore dall'apertura della confezione. Non è stata infatti osservata alcuna crescita di microorganismi sui terreni appropriati in nessuna condizione sperimentale.

Controllo del destino di un inoculo batterico in preparati oftalmici

Quando quantità note di microorganismi sono state messe a contatto con varie soluzioni oftalmiche, sono stati evidenziati diversi effetti in funzione della specie batterica analizzata. In particolare è stata osservata un comportamento ben distinto tra i composti che appaiono caratterizzati da qualità battericide su un più ampio numero di specie come ketotifene, tetrizolina-feniramina, policarpina e formocortal gentamicina e i rimanenti timololo, acido jaluronico, diclofenac e formocortal che manifestano una preponderante azione batteriostatica (Tabelle II-III).

In particolare con gli stafilococchi i preparati battericidi hanno drasticamente ridotto la carica batterica >99.9% già du-

rante le prime 8 ore mentre per gli altri composti l'effetto letale si manifestava su una quota oscillante tra il 40 e il 90% della popolazione batterica iniziale.

Nei confronti degli streptococchi tutti i composti hanno manifestato una potente attività antibatterica con riduzione delle unità formanti colonia di oltre il 99,9% già alle 8 ore dal primo contatto.

Corynebacterium spp. è stato marcatamente inibito da tutti i composti con effetti letali superiori al 99.9% della carica batterica iniziale alle 8 ore, con l'eccezione dell'acido jaluronico e diclofenac che hanno mostrato una riduzione dell'inoculo iniziale intorno al 90%.

Emofili e Neisserie hanno rivelato grande sensibilità a tutti i composti con l'eccezione di quest'ultima specie che ha fatto registrare una sopravvivenza del 20% alle 24 ore con diclofenac.

Nei confronti degli altri patogeni gram-negativi a rapida crescita sono stati osservati effetti diversi in base alla natura del genere studiato e alla temperatura utilizzata (Tabelle II-III).

In particolare, esaminando *E.coli*, ketotifene, tetrizolina-feniramina, policarpina e formocortal-gentamicina confermano le qualità battericide già evidenziate con gli altri patogeni. Formocortal ha inibito il 90% della carica batterica iniziale mentre con gli altri preparati è stato osservato un effetto batteriostatico o ricrescita dei microorganismi.

P.aeruginosa subiva una azione battericida da parte di tutti i preparati pur con differente dinamica manifestando, alle 24

Tabella II

Effetti di vari preparati oftalmici sulla sopravvivenza di specie capaci di infettare l'occhio.

Patogeno	Timololo		Acido ialuronico		Diclofenac		Ketotifene		
	Tamb	35°C	Tamb	35°C	Tamb	35°C	Tamb	35°C	
	Tempo (ore) Unità formanti colonia per ml								
<i>S.aureus</i>	0	1.6x10 ⁴	3.9x10 ⁴	2x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵
	2	1.8x10 ⁴	1.4x10 ⁴	1.3x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.3x10 ⁵	1.4x10 ⁵	5.8x10 ³	<1x10 ²
	4	1.5x10 ⁴	1.2x10 ⁴	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	9x10 ³	1x10 ⁴	1.2x10 ⁵	9x10 ⁴	1.2x10 ⁵	9x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	2.6x10 ³	1x10 ³	9.5x10 ⁴	5.4x10 ⁴	9.5x10 ⁴	5.4x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>S.epidermidis</i>	0	5.8x10 ⁴	5.8x10 ⁴	3.5x10 ⁴	3.5x10 ⁴	3.5x10 ⁴	3.5x10 ⁴	3.5x10 ⁴	3.5x10 ⁴
	2	5.8x10 ⁴	2.1x10 ³	1.8x10 ⁴	2x10 ⁴	1.8x10 ⁴	2x10 ⁴	4.2x10 ³	<1x10 ²
	4	2.3x10 ³	1x10 ³	1x10 ⁴	1.4x10 ⁴	1x10 ⁴	1.4x10 ⁴	1x10 ³	<1x10 ²
	8	2.2x10 ³	1.5x10 ³	5.8x10 ³	9x10 ³	5.8x10 ³	9x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	3.9x10 ³	2.1x10 ³	6x10 ²	2.6x10 ³	6x10 ²	2.6x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>S.haemolyticus</i>	0	3.2x10 ⁴	3.2x10 ⁴	4.5x10 ⁴	4.5x10 ⁴	4.5x10 ⁴	4.5x10 ⁴	4.5x10 ⁴	4.5x10 ⁴
	2	3.2x10 ⁴	3.2x10 ⁴	3.8x10 ⁴	5.9x10 ⁴	3.8x10 ⁴	5.9x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	1x10 ³	5x10 ³	3.4x10 ⁴	3.7x10 ⁴	3.4x10 ⁴	3.7x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	1.1x10 ³	6x10 ²	2.4x10 ⁴	1.1x10 ⁴	2.4x10 ⁴	1.1x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	9x10 ²	2x10 ²	1.2x10 ⁴	9.4x10 ³	1.2x10 ⁴	9.4x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>S.pneumoniae</i>	0	3.7x10 ⁵	1.2x10 ⁵	4.1x10 ⁵	5.8x10 ⁵	1.3x10 ⁴	1.3x10 ⁴	1.3x10 ⁴	1.3x10 ⁴
	2	5.2x10 ⁴	1.3x10 ⁴	2.5x10 ⁵	1.1x10 ⁴	9x10 ³	6x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	2.3x10 ⁴	7.6x10 ³	1x10 ⁴	1.6x10 ²	6.6x10 ³	5.4x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	2.9x10 ³	2x10 ³	1x10 ²	5x10	4.6x10 ³	1.6x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>Streptococcus spp.</i>	0	3.7x10 ⁵	1.2x10 ⁵	4.1x10 ⁵	5.8x10 ⁵	8.9x10 ⁴	8.9x10 ⁴	8.9x10 ⁴	8.9x10 ⁴
	2	5.2x10 ⁴	1.3x10 ⁴	2.5x10 ⁵	1.1x10 ⁴	7.5x10 ⁴	4.8x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	2.3x10 ⁴	7.6x10 ³	1x10 ⁴	1.6x10 ²	7.1x10 ⁴	4.5x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	2.9x10 ³	2x10 ³	1x10 ²	5x10	4.5x10 ⁴	3.1x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	<10	<10	2.5x10 ⁴	2x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>Corynebacterium spp.</i>	0	2.5x10 ⁵	3.2x10 ⁵	3.1x10 ⁵	3.4x10 ⁵	1.9x10 ⁴	1.9x10 ⁴	1.9x10 ⁴	1.9x10 ⁴
	2	2.4x10 ⁵	2.7x10 ⁵	7.6x10 ⁴	2.3x10 ⁵	9.4x10 ³	7.4x10 ³	1x10 ²	<1x10 ²
	4	9.5x10 ⁴	1.1x10 ⁵	4.7x10 ⁴	1.6x10 ⁵	8.6x10 ³	6.8x10 ³	1x10 ²	<1x10 ²
	8	7.2x10 ⁴	1x10 ⁵	2.8x10 ⁴	9.6x10 ⁴	5.6x10 ³	6x10 ³	1x10 ²	<1x10 ²
	24	2.1x10 ⁴	1.7x10 ⁴	9.6x10 ³	7.2x10 ³	<1x10 ²	1x10 ²	1x10 ²	<1x10 ²
<i>H.influenzae</i>	0	4.2x10 ⁴	2.6x10 ⁴	7.2x10 ⁴	7.2x10 ⁴	6x10 ⁴	6x10 ⁴	6x10 ⁴	6x10 ⁴
	2	2x10 ³	3.6x10 ³	4.4x10 ⁴	8x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	6.1x10 ³	7x10	5.3x10 ⁴	3x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	4x10 ²	3x10	1.5x10 ⁴	5x10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>Neisseria spp.</i>	0	2.5x10 ⁴	3.4x10 ⁴	4.8x10 ⁴	8.4x10 ⁴	2.8x10 ⁴	2.8x10 ⁴	2.8x10 ⁴	2.8x10 ⁴
	2	6.1x10 ³	1x10 ⁴	2.4x10 ⁴	2.6x10 ⁴	2.3x10 ⁴	1.5x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	3.7x10 ³	1x10 ⁴	2.2x10 ⁴	8.2x10 ³	1.7x10 ⁴	1.1x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	1x10 ³	2.7x10 ³	7x10 ³	3x10 ³	1.3x10 ⁴	1x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	<10	<10	8x10 ³	5.4x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²

continua a pag. 98

Contaminazione spontanea di preparati oftalmici

Spontaneous contamination of ocular medications

Marchese, Debbia
e Schito

Tabella II (seguito)

Patogeno	Timololo		Acido ialuronico		Diclofenac		Ketotifene		
	Tamb	35°C	Tamb	35°C	Tamb	35°C	Tamb	35°C	
	Tempo (ore) Unità formanti colonia per ml								
<i>E.coli</i>	0	1x10 ⁴	2x10 ⁴	7x10 ⁴	6.5x10 ⁴	9x10 ⁴	9x10 ⁴	9x10 ⁴	9x10 ⁴
	2	7x10 ³	2.5x10 ⁴	7.9x10 ⁴	7.7x10 ⁴	7.7x10 ⁴	6x10 ⁴	4.6x10 ³	<1x10 ²
	4	2x10 ³	1x10 ⁴	7.3x10 ⁴	4.3x10 ⁴	6.5x10 ⁴	5.2x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	4x10 ³	7x10 ³	3x10 ⁴	3.6x10 ⁴	6.1x10 ⁴	3.6x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	2.6x10 ⁵	3.1x10 ⁶	6.3x10 ⁵	2.4x10 ⁶	4x10 ⁴	2.4x10 ⁶	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>P.aeruginosa</i>	0	2.5x10 ⁵	3.2x10 ⁵	3.1x10 ⁵	3.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵
	2	2.4x10 ⁵	2.7x10 ⁵	7.6x10 ⁴	2.3x10 ⁵	1x10 ⁵	7.9x10 ⁴	4.1x10 ⁴	<1x10 ²
	4	9.5x10 ⁴	1.1x10 ⁵	4.7x10 ⁴	1.6x10 ⁵	8x10 ⁴	1x10 ⁵	8.2x10 ³	<1x10 ²
	8	7.2x10 ⁴	1x10 ⁵	2.8x10 ⁴	9.6x10 ⁴	6.5x10 ⁴	6.1x10 ⁴	1.4x10 ³	<1x10 ²
	24	2.1x10 ⁴	1.7x10 ⁴	9.6x10 ³	7.2x10 ³	2.5x10 ⁴	2.4x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>Acinetobacter spp.</i>	0	4.1x10 ⁴	1x10 ⁴	5.4x10 ⁴	7.4x10 ⁴	6.2x10 ⁴	6.2x10 ⁴	6.2x10 ⁴	6.2x10 ⁴
	2	1.2x10 ⁴	1x10 ⁴	4.7x10 ³	6.2x10 ⁴	5.4x10 ⁴	4.2x10 ⁴	3.2x10 ³	6x10 ²
	4	9x10 ³	3x10 ³	2.5x10 ⁴	3.5x10 ⁴	3.1x10 ⁴	3.2x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	8x10 ³	6x10 ³	1.6x10 ⁴	2.9x10 ⁴	2.4x10 ⁴	1.6x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	4x10 ⁵	2.9x10 ⁶	2.1x10 ²	1x10 ²	7.2x10 ³	3.4x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>C.albicans</i>	0	6.3x10 ³	1.5x10 ³	7.1x10 ³	7x10 ³	9.2x10 ³	9.2x10 ³	9.2x10 ³	9.2x10 ³
	2	1.1x10 ⁴	6.8x10 ³	9x10	1x10 ²	4.6x10 ³	3x10 ³	7.8x10 ³	9.2x10 ³
	4	1x10 ⁴	6.4x10 ³	8x10	8x10 ²	1.2x10 ³	3.4x10 ³	7.2x10 ³	6.4x10 ³
	8	1.7x10 ⁴	8x10 ³	6x10	7x10 ²	4x10 ²	1.6x10 ³	6x10 ³	3.6x10 ³
	24	6.4x10 ⁴	4.4x10 ⁴	3.9x10 ³	1.8x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²

Tamb, Temperatura ambiente.

ore, una riduzione dal 60 al >99.95 della carica batterica utilizzata inizialmente.

La quota di *Acinetobacter spp.* inibita variava tra l'86 (formocortal) e >99.9% per i restanti composti con l'eccezione dell'acido ialuronico ove è stata notata una crescita del microorganismo alle 24 ore.

C.albicans ha subito un effetto batteriostatico durante le prime 8 ore di esposizione da parte di tutti i preparati, mentre alle 24 ore è stata registrata una riduzione di circa il 99% della popolazione iniziale e in molti casi non sono state più ritrovate cellule vitali.

Valutazione dell'adesività alla plastica dei contenitori da parte delle diverse specie batteriche

Come riportato nella Tabella IV, che riassume le variazioni delle concentrazioni batteriche studiate in funzione del

tempo, non sono state osservate differenze sostanziali di comportamento adesivo tra le specie di stafilococchi saggiati. Lo studio dimostra in particolare che l'inoculo batterico iniziale tende a ridursi con il passare del tempo indipendentemente dal contenitore utilizzato e con la stessa cinetica.

È stato osservato che *S.aureus* riduce la propria consistenza numerica nelle 24 ore da 2.2x10⁴ a <10² CFU/ml nel campione di plastica e sono stati notati valori dello stesso ordine di grandezza (<1x10²) per gli esperimenti condotti nel recipiente di vetro a 35°C. Ancora, a 35°C, introducendo una quantità nota di *S. epidermidis*, corrispondente a 1.6x10⁴ CFU/ml, alla 24^a ora sono stati conteggiati 1x10³ microorganismi per il campione di plastica e 1.8x10³ CFU/ml per il controllo di vetro.

Analogamente nelle diverse condizioni

Tabella III

Effetti di vari preparati oftalmici sulla sopravvivenza di specie capaci di infettare l'occhio.

Patogeno	Tetrizolina -feniramina		Pilocarpina		Formocortal		Formocortal- gentamicina		
	Tamb	35°C	Tamb	35°C	Tamb	35°C	Tamb	35°C	
	Tempo (ore)								
Unità formanti colonia per ml									
<i>S.aureus</i>	0	1.5x10 ⁴	1x10 ⁴	1.8x10 ⁵	1.8x10 ⁵	1.9x10 ⁵	1.9x10 ⁵	1.9x10 ⁵	1.9x10 ⁵
	2	1.1x10 ⁴	1x10 ⁴	1.5x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.3x10 ⁵	1.1x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	8x10 ³	5x10 ³	1.7x10 ⁵	1.1x10 ⁵	2.1x10 ⁵	1x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	6.6x10 ³	1.2x10 ³	1x10 ⁵	9x10 ⁴	2x10 ⁵	1x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	1x10 ²	<10	5x10 ³	<1x10 ²	8x10 ⁴	2x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>S.epidermidis</i>	0	5.8x10 ⁴	5.8x10 ⁴	1.3x10 ⁵	1.3x10 ⁵	1.5x10 ⁵	1.5x10 ⁵	1.5x10 ⁵	1.5x10 ⁵
	2	7.2x10 ²	2x10 ²	6.6x10 ⁴	1.3x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.2x10 ⁵	1.1x10 ⁵
	4	8x10	7x10	1.4x10 ⁴	5.5x10 ³	1.2x10 ⁵	1.2x10 ⁵	1x10 ⁵	<1x10 ⁵
	8	5x10	3x10	1x10 ³	<1x10 ²	1x10 ⁵	5x10 ⁴	1x10 ⁵	<1x10 ⁴
	24	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>S.haemolyticus</i>	0	3.2x10 ⁴	3.2x10 ⁴	3.2x10 ⁴	3.2x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴
	2	3.8x10 ³	8x10	2.2x10 ⁴	1.6x10 ⁴	3.8x10 ⁴	3.6x10 ⁴	3.5x10 ⁴	3x10 ⁴
	4	3x10 ²	4x10	7x10 ³	6.5x10 ³	3.4x10 ⁴	3.2x10 ⁴	3.4x10 ⁴	3x10 ⁴
	8	1x10 ²	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	2x10 ⁴	1.5x10 ⁴	2.2x10 ⁴	2.8x10 ⁴
	24	2x10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	1x10 ⁴	1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>S.pneumoniae</i>	0	8.5x10 ⁵	3.1x10 ⁵	3.2x10 ⁵	3.2x10 ⁵	3.2x10 ⁵	3.2x10 ⁵	3.2x10 ⁵	3.2x10 ⁵
	2	7x10	5x10	2.6x10 ⁵	2.6x10 ⁵	2.7x10 ⁵	2.6x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	2x10	<10	2.1x10 ⁵	2x10 ⁵	2.1x10 ⁵	2x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	<10	<10	1.8x10 ⁵	1.9x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	3x10 ⁴	<1x10 ²	1x10 ⁵	1x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>Streptococcus spp.</i>	0	8.5x10 ⁵	3.1x10 ⁵	2.6x10 ⁴	2.6x10 ⁴	7x10 ⁴	7x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴
	2	7x10	5x10	2x10 ⁴	1.5x10 ⁴	4.8x10 ⁴	4.3x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	2x10	<10	1.4x10 ⁴	<1x10 ²	1x10 ⁴	1x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	1x10 ⁴	1x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>Corynebacterium spp</i>	0	2.5x10 ⁵	2.1x10 ⁵	2.9x10 ⁴	2.9x10 ⁴	3.1x10 ⁴	3.1x10 ⁴	3x10 ⁴	3x10 ⁴
	2	5.1x10 ⁴	8.4x10 ⁴	8x10 ³	7.4x10 ³	2.8x10 ⁴	1.4x10 ⁴	2.6x10 ⁴	2.4x10 ⁴
	4	3.8x10 ⁴	1.9x10 ³	1x10 ³	1x10 ³	1.3x10 ⁴	7x10 ³	2x10 ⁴	1.2x10 ⁴
	8	2.4x10 ³	1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>H.influenzae</i>	0	8.7x10 ⁴	1.6x10 ⁴	8.8x10 ⁴	8.8x10 ⁴	1.8x10 ⁵	1.8x10 ⁵	8.8x10 ⁴	8.8x10 ⁴
	2	4x10 ²	4x10 ²	1x10 ³	1x10 ²	4x10 ⁴	1.7x10 ⁴	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	4x10	3x10	<1x10 ²	<1x10 ²	1.6x10 ⁴	1x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>Neisseria spp</i>	0	8.5x10 ⁴	6.6x10 ⁴	1.1x10 ⁵	1.1x10 ⁵	1.6x10 ⁵	1.6x10 ⁵	7.3x10 ⁴	7.3x10 ⁴
	2	1.2x10 ⁴	6.5x10 ³	1x10 ³	1x10 ²	4x10 ⁴	1x10 ³	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	9x10 ³	9x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	2.3x10 ³	8x10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²

continua a pag. 100

Contaminazione
spontanea di preparati
oftalmici
*Spontaneous
contamination
of ocular medications*

LAVORI ORIGINALI/ORIGINAL ARTICLES

Marchese, Debbia
e Schito

Tabella III (seguito)

Patogeno	Tetrizolina -feniramina		Pilocarpina		Formocortal		Formocortal- gentamicina		
	Tamb	35°C	Tamb	35°C	Tamb	35°C	Tamb	35°C	
	Tempo (ore)		Unità formanti colonia per ml						
<i>E.coli</i>	0	3.8x10 ⁴	2.8x10 ⁴	1.3x10 ⁵	1.3x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵	1.4x10 ⁵
	2	1.9x10 ⁴	1x10 ³	9x10 ⁴	1.6x10 ⁵	1.8x10 ⁵	2.6x10 ⁵	4.6x10 ³	<1x10 ²
	4	1x10 ³	5x10 ²	6x10 ⁴	8x10 ⁴	2.2x10 ⁵	3.8x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	5x10 ²	6x10	2.3x10 ⁴	4x10 ⁴	3x10 ⁵	4x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	1x10 ²	5x10 ²	>1x10 ⁷	>1x10 ⁷	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>P.aeruginosa</i>	0	2.5x10 ⁵	2.1x10 ⁵	3.9x10 ⁵	3.9x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	1.2x10 ⁵	1.2x10 ⁵
	2	5.1x10 ⁴	8.4x10 ⁴	3.2x10 ⁵	3.2x10 ⁵	2.2x10 ⁵	2.2x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	4	3.8x10 ⁴	1.9x10 ³	2.4x10 ⁵	2x10 ⁴	2.2x10 ⁵	2.5x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	8	2.4x10 ³	1x10 ²	1x10 ⁵	<1x10 ²	2.1x10 ⁵	3x10 ⁵	<1x10 ²	<1x10 ²
	24	<10	<10	5x10 ³	<1x10 ²	5x10 ⁵	>1x10 ⁷	<1x10 ²	<1x10 ²
<i>Acinetobacter spp.</i>	0	4.2x10 ⁴	6.6x10 ⁴	1.7x10 ⁵	1.7x10 ⁵	1.5x10 ⁵	1.5x10 ⁵	1.5x10 ⁵	1.5x10 ⁵
	2	3.7x10 ⁴	1.7x10 ⁴	1.5x10 ⁵	1.2x10 ⁵	1.5x10 ⁵	1.5x10 ⁵	1.3x10 ⁵	1.3x10 ⁵
	4	1.7x10 ⁴	2x10 ⁴	1.1x10 ⁵	8x10 ⁴	1.2x10 ⁵	5x10 ⁴	1.2x10 ⁵	1.1x10 ⁵
	8	5x10 ³	5x10 ²	8x10 ⁴	2.4x10 ⁴	7.8x10 ⁴	8x10 ³	7x10 ⁴	2x10 ⁴
	24	<10	<10	1x10 ⁴	<1x10 ²	2.1x10 ⁴	<1x10 ²	1x10 ⁴	<1x10 ²
<i>C.albicans</i>	0	8.1x10 ³	7x10 ³	1.7x10 ⁴	1.7x10 ⁴	1.3x10 ⁴	1.3x10 ⁴	1x10 ⁴	1x10 ⁴
	2	1.9x10 ³	2x10 ³	7.5x10 ³	7.7x10 ³	7.2x10 ³	9.7x10 ³	7.8x10 ³	9.2x10 ³
	4	2x10 ²	1x10 ²	1.3x10 ⁴	6.8x10 ³	1x10 ⁴	6.8x10 ³	1x10 ⁴	6.4x10 ³
	8	1x10 ²	5x10	3.3x10 ⁴	2.3x10 ⁴	3x10 ⁴	3x10 ⁴	6.3x10 ³	3.3x10 ³
	24	<10	<10	1x10 ³	1x10 ³	1x10 ³	1x10 ³	1x10 ²	1x10 ²

Tabella IV

Variazioni della carica batterica come indice di adesività dei batteri sulla superficie del contenitore di plastica.

	Tempo (ore)	T _{amb}		T35°C	
		Campione	Vetro	Campione	Vetro
<i>S.aureus</i>	0	2,4x10 ⁴	2,4x10 ⁴	2,4x10 ⁴	2,4x10 ⁴
	2	2,2x10 ⁴	1,4x10 ⁴	2,2x10 ⁴	1,5x10 ⁴
	4	1x10 ⁴	7x10 ³	1,5x10 ⁴	1x10 ⁴
	8	1x10 ⁴	7,6x10 ³	1,6x10 ⁴	1x10 ⁴
	24	1,3x10 ³	2x10 ²	<10 ²	4x10 ²
<i>S.epidermidis</i>	0	1,4x10 ⁴	1,4x10 ⁴	1,5x10 ⁴	1,5x10 ⁴
	2	1,2x10 ⁴	1x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1x10 ⁴
	4	8x10 ³	5x10 ³	1,1x10 ⁴	1x10 ⁴
	8	2,9x10 ³	5x10 ³	1x10 ⁴	6,9x10 ³
	24	<x10 ²	1x10 ²	4x10 ³	1x10 ³
<i>S.haemolyticus</i>	0	1,1x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴
	2	9x10 ³	1,1x10 ⁴	9,6x10 ³	1,3x10 ⁴
	4	2,5x10 ³	2x10 ³	9,5x10 ³	4,6x10 ³
	8	1,4x10 ³	1x10 ³	8x10 ³	4,5x10 ³
	24	<x10 ²	1x10 ²	2x10 ³	1x10 ³

S. haemolyticus è passato da 4.3×10^4 a circa 10^3 microorganismi vitali nelle 24 ore. I dati ottenuti a temperatura ambiente nei confronti dei tre microorganismi sono sovrapponibili con quelli ottenuti a 35°C .

La riduzione del numero dei sopravvissuti diviene quindi apprezzabile, (dal 90 al 99%), solo dopo 24 ore alla temperatura di 35°C sia nel contenitore di plastica sia nel contenitore di vetro. Questo comportamento indica che tra i batteri sospesi in soluzione fisiologica una parte va incontro ad un processo di lenta morte naturale. Fenomeni di adesione alla plastica sono invece caratterizzati da alta velocità di attacco dei microorganismi al substrato (Marchese *et al.*, 1996).

DISCUSSIONE

Le esperienze condotte in questo studio dimostrano che la contaminazione spontanea delle confezioni oftalmiche una volta aperte è da considerarsi altamente improbabile anche dopo un periodo di 24 ore.

Tutti i preparati studiati esprimono in generale un'attività di tipo antibatterico e comunque limitative della proliferazione di microorganismi considerati patogeni in campo oftalmologico.

Le proprietà chimico-fisiche dei contenitori di plastica sono tali da non presentare effetti proadesivi valutabili con le tecniche impiegate e con i patogeni analizzati.

In base all'esperienza acquisita in questa sperimentazione, i preparati oftalmici sia per la struttura del contenitore da 0,5 ml che presenta un'apertura piuttosto stretta, sia per la natura delle soluzioni medicamentose che in genere limitano la proliferazione dei microorganismi, non sono facilmente soggetti a contaminazione, non solo nei tempi brevi previsti dalla normativa internazionale ma neppure nell'arco delle 24 ore (Van Santvliet *et al.*, 1996).

I vari preparati, pur non essendo costituiti o non contenendo sostanze antimicrobiche specifiche, con l'eccezione di formocortal-gentamicina, dimostrano di esprimere capacità battericide nei confronti di tutti i patogeni saggiati, con l'ec-

cezione di *C. albicans* che ha comunque mostrato una limitata capacità di sopravvivenza nelle 24 ore. Questi microorganismi, tuttavia, sono più raramente coinvolti nelle varie affezioni dell'occhio rispetto ad altri patogeni.

La terapia di gran parte delle infezioni oculari esterne prevede l'impiego di antibiotici ad uso topico (O'Brien and Green, 1995a e 1995b). Il principale vantaggio dell'impiego di farmaci ad uso locale dovrebbe essere quello di ottenere elevati livelli dell'antimicrobico con minimo assorbimento sistemico. In realtà a causa dell'ammiccamento e della secrezione lacrimale l'antibiotico viene diluito. È pertanto difficile ottenere concentrazioni utili di farmaco per un lungo periodo, anche se l'esperienza clinica ha messo in evidenza la validità di molte formulazioni che rilasciano il principio attivo lentamente. Sono largamente impiegati i sulfamidici, la penicillina e l'ampicillina, gli aminoglicosidi, le tetracicline, il cloramfenicolo e i macrolidi. Anche molecole non usate per via parenterale a causa della loro tossicità trovano spazio nelle applicazioni topiche (polimixine, le colistine, la bacitracina).

In generale contro i patogeni gram-negativi si utilizzano preparati a base di tobramicina o gentamicina, mentre eritromicina, bacitracina, polimixina, trimetoprim, o neomicina/polimixina sono validi per il trattamento di infezioni sostenute da gram-positivi. A causa delle problematiche appena citate, si suggerisce una somministrazione frequente (ogni 2-4 ore) per 7-10 giorni in funzione del tipo di infezione. Anche soluzioni a base di fluorochinoloni sono utilizzate, ma più raramente. Spesso un organismo che risulta resistente in vitro è eradicato in vivo. Ciò è dovuto all'elevata concentrazione di antibiotico raggiunta localmente che supera, per un tempo utile, quella che sarebbe raggiunta nel siero o nei tessuti dopo somministrazione sistemica. Alcune infezioni, sostenute da gonococchi sono trattate sia localmente sia per via parenterale con ceftriaxone. Nel neonato si tratta topicamente anche a scopi profilattici con eritromicina (O'Brien and Green, 1995a e 1995b).

Contaminazione
spontanea di preparati
oftalmici

Spontaneous
contamination
of ocular medications

Marchese, Debbia
e Schito

A tale proposito vale la pena sottolineare che, proprio per tutte le problematiche di resistenza agli antibiotici (Davis, 1994; Gold and Moellering, 1996; O'Brien, 1997; Levi, 1998), l'uso di composti diversi nella terapia locale e in quella sistemica rappresenta un'utile modalità d'impiego degli antibiotici.

I contenitori da 0,5 ml dei colliri studiati risultano inerti, al pari del vetro, e non sembrano fornire un substrato specifico per l'adesività dei batteri (Dickinson and Bisno, 1989a, 1989b; Goldman and Pier, 1993; Van Santvliet *et al.*, 1996). I microorganismi non possono perciò essere sequestrati in modo significativo dalla plastica. Tutti i materiali che possono essere utilizzati per composti in uso clinico devono infatti avere caratteristiche capaci di prevenire l'adesione dei microorganismi. La presente esperienza appare di sicuro interesse in quanto, come già citato, i batteri planctonici sono più facilmente eradicabili di quelli sessili e non sono in grado di attivare quei geni che li renderebbero ancor più resistenti alle difese dell'ospite ed alle terapie antibiotiche. Come è emerso nel presente studio, la probabilità che il collirio nel contenitore da 0,5 ml aperto si inquinasse spontaneamente sono remote considerando la sola esposizione ambientale. La più importante problematica della contaminazione successiva ai tocamenti di superfici oculari colonizzate o addirittura infette (Schein *et al.*, 1992) è in parte superabile viste le insospettite attività antimicrobiche espresse da tutti i medicinali che tendono non solo a contenere il numero dei patogeni eventualmente passati in sospensione ma anche a eliminarli con rapidità.

Alla luce dei risultati ottenuti sembra possibile prospettare alle Autorità preposte il suggerimento di prolungare nel tempo l'utilizzo dopo prima apertura dei preparati oftalmici studiati.

BIBLIOGRAFIA

- Cheng K.H., S.L. Leung, H.W. Hoekman, et al.** Incidence of contact-lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. *Lancet* 354: 181-185, 1999.
- Costerton J.W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, et al.** Biofilms the customized microniche. *J.Bacteriol.* 176: 2137-2142, 1994.
- Costerton J.W., Stewart, P.S and E.P. Greenberg.** Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322, 1999.
- Darveau R.P., A. Tanner, R.C. Page.** The microbial challenge in Periodontitis. *Periodontology* 2000 14:12-32, 1997.
- Davis, D.G., A.M. Chakrabarty and G.G. Geesey.** Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1181-1186, 1993.
- Davies J.** Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375-382, 1994.
- Dickinson, G.M. and A.L. Bisno.** Infections associated with indwelling devices: concepts of pathogenesis; infections associated with intravascular devices. *Antimicrob. Agents. Chemother* 38: 597-601, 1989a.
- Dickinson, G.M. and A.L. Bisno.** Infections associated with indwelling devices: infections related to intravascular devices. *Antimicrob. Agents. Chemother* 38: 597-601, 1989b.
- Gold HS, Moellering RC.** Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 35: 1445-1453, 1996.
- Goldmann D.A. and Pier G.B.** Pathogenesis of Infections Related to Intravascular Catheterization. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 176-192, 1993.
- Høding G. and H. Sjørusen.** Bacterial contamination of drops and dropper tips of in use multidose eye drop bottles. *Acta Ophthalmologica*, 60: 213-22, 1982.
- Levy S.B.** Multidrug resistance - A sign of the times. *N Engl J Med* 338: 1376-1378, 1998.
- Marchese A., E.A. Debbia, S. Massaro, U. Campora and G. C. Schito.** Brodimoprim: effects of sub-MIC on virulence traits of respiratory and urinary tract pathogens and on plasmid transfer and stability. *J. Chemother.* 8: 171-177, 1996.
- National Clinical Committee for Clinical Laboratory Standards 1997.** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Third Edition: Approved Standard M 7-A3.
- O'Brien T.P., Green W.R.** *Conjunctivitis in Mandell G.L. Infectious Diseases. Fourth Edition Churchill Livingstone, 1995.*
- O'Brien T.P., Green W.R.** Eye Infections. In Principles and practice of infectious diseases, 4th edn (Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Dolin, R., Eds), pp. 1103-1136. Churchill Livingstone, New York, 1995.
- O'Brien T.F.** The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis* 24 Suppl 1: S2-S8, 1997.
- Schein O.D., P.L. Hibberd, T. Starch, A.S. Baker, KR. Kenyon.** Microbial contamination of in-use ocular medications. *Arch. Ophthalmol.* 110: 82-85, 1992.
- Van Santvliet L., T. Sam and A. Ludwig.** Packing of ophthalmic solutions-Influence on stability, sterility, eye drop instillation and patient compliance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42: 375-384, 1996.