



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* από θήκες φακών επαφής υγιών εθελοντών

POST GRADUATE THESIS

Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from healthy volunteers' contact lenses cases

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ /NAME OF STUDENT

Νικόλα Ιωάννα

Nikola Ioanna

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Μπελούκας Απόστολος

Beloukas Apostolos

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2020



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

**Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated
from healthy volunteers' contact lenses cases**

Nikola Ioanna

Registration Number: 17012

e-mail: ioannagnikola@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Beloukas Apostolos

SECOND SUPERVISOR

Giannoulaki Eleni

THIRD SUPERVISOR

Pappa Olga

AIGALEO 2020

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Όνομα φοιτήτριας: Ιωάννα Νικόλα

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση», του τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας και κατά συνέπεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, επίκουρο καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών, Μπελούκα Απόστολο. Η υποστήριξη και διαθεσιμότητά του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αποτέλεσε σπουδαία βοήθεια, συμβάλλοντας ποικιλοτρόπως στην ολοκλήρωσή της, παρέχοντας μεταξύ άλλων πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγηση.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών καθώς και την κα. Κίουση Δήμητρα του τμήματος Οπτικής και Οπτομετρίας για την συλλογή των δειγμάτων. Οι παρατηρήσεις και συμβουλές κάθε ξεχωριστού μέλους της οποίας, βοήθησαν ουσιαστικά στη βελτίωση της εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω, την διδακτορική φοιτήτρια Διολή Χρύσα για την έμπρακτη βοήθειά της στη ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την αγάπη, την κατανόηση και την υποστήριξή τους.

Περίληψη

Εισαγωγή: Αρκετοί άνθρωποι που υποφέρουν από κάποια διαθλαστική ανωμαλία προτιμούν να φορούν φακούς επαφής παρά διορθωτικά γυαλιά οράσεως. Έρευνες έχουν δείξει ότι ένα μεγάλο ποσοστό των χρηστών φακών επαφής κάνει λανθασμένη χρήση ακολουθώντας λάθος βήματα υγιεινής. Οι φακοί επαφής και οι θήκες στις οποίες αυτοί φυλάσσονται αποτελούν ιδανικούς τόπους συγκέντρωσης βακτηρίων, γεγονός που ενέχει κίνδυνο πρόκλησης σοβαρών οφθαλμολογικών λοιμώξεων.

Σκοπός: Ο έλεγχος της παρουσίας του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* σε θήκες φακών επαφής υγιών εθελοντών.

Μέθοδος: Συνολικά εξετάστηκαν 82 θήκες φακών επαφής υγιών εθελοντών, οι οποίες συλλέχθηκαν από το προσωπικό του εργαστηρίου Οπτικής Οπτομετρίας και έπειτα στάλθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας (E.M.M.A.) για μικροβιακό έλεγχο. Για την ταυτοποίηση του βακτηρίου εφαρμόστηκαν καλλιεργητικές και βιοχημικές μέθοδοι. Στη συνέχεια, τα επιβεβαιωμένα στελέχη *Ps. aeruginosa* μελετήθηκαν για τα επίπεδα ευαισθησίας σε 11 αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως κατά την κλινική πράξη, με την μέθοδο διάχυσης αντιβιοτικών σε άγαρ.

Αποτελέσματα: Από τα 82 δείγματα μόνο τα 7 ήταν θετικά (7/82 ή 8,5%) για την ανάπτυξη *Ps. aeruginosa*, Βάσει των κατευθυντήριων οδηγιών του EUCAST κανένα από τα στελέχη δεν ήταν ευαίσθητο στα υπό εξέταση αντιβιοτικά.

Συμπεράσματα: Το γεγονός ότι, στις θήκες φακών επαφής, ανιχνεύθηκαν πολύ-ανθεκτικά και ανθεκτικά στελέχη *Ps. aeruginosa*, εκθέτει τα άτομα-χρήστες φακών επαφής σε επιπλέον κίνδυνο εκδήλωσης ανίατης οφθαλμολογικής λοίμωξης.

Abstract

Introduction: Many people who suffer from refractive error prefer to wear contact lenses rather than eyeglasses. Contact lenses and the cases in which they are stored are ideal places for bacterial growth and this increases the risk of ocular infection development.

Purpose: The purpose of this study was to examine the presence of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in healthy volunteers' contact lenses cases

Method: 82 contact lenses cases were collected by the Laboratory of Optics and Optometry personnel and then they were sent to the Molecular Microbiology and Immunology (EMMA) for microbial testing. Bacterial identification was based on basic cultural and biochemical methods. Additionally, confirmed *Ps. aeruginosa* isolates were tested for their antimicrobial susceptibility by disk diffusion assay in 11 commonly used antibiotics

Results: In total were examined 82 samples, but only 7 were *Ps. aeruginosa* positive (7/82 ή 8.5 %). According to EUCAST guidelines, none of those isolates were sensitive to those commonly used antibiotics.

Discussion: The detection of multi-drug resistant and resistant isolates in contact lens cases, introduces health safety issues and exposes contact lens wearers to an additional risk of developing an incurable eye infection

| | |
|--|-----|
| Περιεχόμενα | |
| Δήλωση περί λογοκλοπής | i |
| Ευχαριστίες | ii |
| Περίληψη | iii |
| Abstract | iv |
| Συντομογραφίες | vi |
| Πρόλογος | 1 |
| Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό μέρος | 2 |
| 1.1 Εισαγωγή | 2 |
| 1.2 Φλεγμονές του κερατοειδή | 3 |
| 1.3 Βιοϋμένια | 6 |
| 1.4 Γενικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 7 |
| 1.5 Λοιμώξεις από το βακτήριο <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9 |
| 1.6 Μηχανισμοί αντοχής στο βακτήριο <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 10 |
| Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι | 12 |
| 2.1 Θρεπτικά υποστρώματα και αντιδραστήρια | 12 |
| 2.1.1 Θρεπτικός ζωμός Nutrient Broth | 12 |
| 2.1.2 Θρεπτικό υπόστρωμα <i>Pseudomonas</i> Agar Base | 12 |
| 2.1.3 Θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey agar No.2 | 12 |
| 2.1.4 Θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar | 12 |
| 2.1.5 Θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton agar | 13 |
| 2.1.6 Θρεπτικό υπόστρωμα φύλαξης στελεχών στους -80°C | 13 |
| 2.1.7 Οξειδάση | 13 |
| 2.2 Συλλογή δειγμάτων | 14 |
| 2.3 Πειραματική διαδικασία απομόνωσης στελεχών <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 14 |
| 2.4 Έλεγχος επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά | 16 |
| Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα | 17 |
| 3.1 Αποτελέσματα επώασης σε Nutrient Broth | 17 |
| 3.2 Αποτελέσματα επίστρωση σε Mc Conkey και σε <i>Pseudomonas</i> Agar Base | 18 |
| 3.3 Αποτελέσματα δοκιμασίας οξειδάσης | 19 |
| 3.4 Αποτελέσματα επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά | 20 |
| 3.5 Συσχέτιση μικροβιολογικών ευρημάτων και διάρκεια χρήσης των θηκών φακών επαφής | 21 |
| Κεφάλαιο 4. Συζήτηση | 30 |
| Αναφορές | 31 |

Συντομογραφίες

| | Αγγλική ορολογία | Ελληνική ορολογία |
|----------------|------------------------------------|--|
| AIDS | Acquired Immunodeficiency Syndrome | Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας |
| MDR | Multidrug Resistant | Πολυ-ανθεκτικά |
| PIP | Piperacillin | Πιπερακιλλίνη |
| TIC | Ticarcillin | Τικαρκιλλίνη),: |
| TZP | Piperacillin/ tazobactam | Πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη |
| FEP | Cefepime | Κεφεπίμη), |
| CAZ | Ceftazidime | Κεφταζιδίμη) |
| IMP | Imipenem | Ιμιπενέμη), |
| MEM | Meropenem | Μεροπενέμη), |
| ATM | Aztreoname | Αζτρεονάμη |
| NN | Tobramycin | Τομπραμυκίνη), |
| AN | Amicacin | Αμικασίνη), |
| CIP | Ciprofloxacin | Σιπροφλοξασίνη) |
| E.M.M.A | | Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας |

Πρόλογος

Οι λοιμώξεις του οφθαλμού αποτελούν ένα ιδιαίτερα σοβαρό ζήτημα τόσο για τους ίδιους τους ασθενείς όσο και για τους κλινικούς ιατρούς. Η συστηματική χρήση φακών επαφής, συγκαταλέγεται στους πιο κοινούς παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης βακτηριακής κερατίτιδας, μια λοίμωξη ιδιαίτερα απειλητική για την όραση, η οποία χωρίς τη λήψη έγκαιρης και κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε ολική τύφλωση. Μεταξύ των πιο συχνών παθογόνων που ενοχοποιούνται για την πρόκληση κερατίτιδας που σχετίζεται με την χρήση φακών επαφής είναι το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Επομένως, το προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας αποφάσισε να συνεργαστεί με το εργαστήριο της Οπτικής Οπτομετρίας, με στόχο τον έλεγχο της παρουσίας του βακτηρίου *Ps. aeruginosa* σε θήκες φακών επαφής, που προέρχονταν από υγιείς εθελοντές. Η συγκεκριμένη μελέτη θα βοηθήσει στην εκτίμηση της συχνότητας εύρεσης του βακτηρίου *Ps. aeruginosa* σε τέτοιου είδους δείγματα αλλά και του κινδύνου που διατρέχει ο εκάστοτε χρήστης φακών επαφής. Είναι ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα, για το οποίο υπάρχει περιορισμένος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών. Ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο ήταν τα υψηλά επίπεδα αντοχής που εμφάνισαν τα στελέχη που απομονώσαμε. Μελλοντικά, θα θέλαμε να εμβαθύνουμε στο κομμάτι των αντοχών και να μελετήσουμε τους μηχανισμούς αντοχής (π.χ. γονίδια καρβαπενεμασών) που μπορεί να διαθέτουν τα συγκεκριμένα στελέχη, εφαρμόζοντας μοριακές μεθόδους. Τέλος, θα επιδιώξουμε τη σύναψη επιπλέον συνεργασιών με εργαστήρια του Τμήματός μας, για την διερεύνηση θεμάτων, παρόμοιων με αυτό που σας παρουσιάζω, για τα οποία απαιτείται η συντονισμένη δράση διαφορετικών τομέων.

Κεφάλαιο 1 Θεωρητικό Μέρος

1.1 Εισαγωγή

Οι θήκες φακών επαφής δύνανται να επιμολυνθούν με πληθώρα μικροοργανισμών. Το γεγονός αυτό εκθέτει τους χρήστες φακών επαφής σε υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρής οφθαλμολογικής λοίμωξης, όπως η μικροβιακή κερατίτιδα [1, 2].

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, έχουν αναφερθεί αρκετά περιστατικά λοιμώξεων του οφθαλμού που σχετίζονται με τη χρήση φακών επαφής και θηκών επιμολυσμένων με βακτήρια, ιούς, μύκητες και πρωτόζωα. Η συχνότητα επιμόλυνσης από βακτήρια αγγίζει το 19% με 81%, από πρωτόζωα το 4% με 24% και από μύκητες το 24% με 59% [3,4,5].

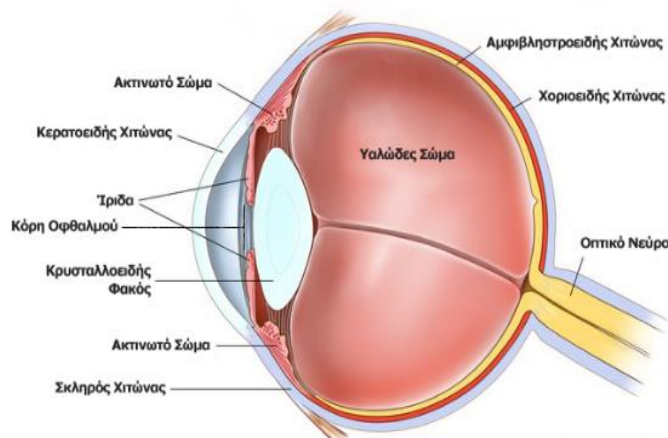
Στα βασικά παθογόνα που αναπτύσσονται στο εσωτερικό των θηκών φακών επαφής περιλαμβάνονται τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, τα πρωτόζωα του γένους *Acanthamoeba* και οι μύκητες του γένους *Fusarium* [2,6,7].

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις, προκαλούν κερατίτιδα και μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια όρασης. Τα βακτήρια του γένους *Serratia* συχνά απομονώνονται από έλκη του κερατοειδούς ενώ αρκετά περιστατικά ασθενών με μικροβιακή κερατίτιδα έχουν συσχετιστεί με την επιμόλυνση των θηκών από *Staphylococcus*. Τα πρωτόζωα του γένους *Acanthamoeba*, τα οποία ζουν ελεύθερα στο περιβάλλον, μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή απώλεια όρασης. Η έκθεση σε μύκητες του γένους *Fusarium* συμβάλει στην εκδήλωση κερατίτιδας, σε σημαντική εξασθένηση της όρασης και σε μόνιμη βλάβη του κερατοειδούς [8, 9, 10,11].

Θεωρητικά, τα διαλύματα καθαρισμού των φακών επαφής αδρανοποιούν τα δυνητικά παθογόνα. Ωστόσο, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ανθεκτικοί καθώς διαθέτουν ένα σύνολο μηχανισμών αντίστασης. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αναπτύσσονται στις θήκες φύλαξης των φακών επαφής εκφράζουν το ένζυμο καταλάση που διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου [6], ενώ κάποιοι άλλοι σχηματίζουν βιοϋμένια (ή βιομεμβράνες). Τα βιοϋμένια είναι μικροβιακές κοινότητες που δημιουργούνται σε οποιοδήποτε συμπαγές υπόστρωμα καλυμμένο με νερό και παρουσιάζουν υψηλή αντοχή σε αντιβιοτικά, απολυμαντικά και απορρυπαντικά [2, 12].

1.2 Φλεγμονές του κερατοειδή

Η εξωτερική επιφάνεια του οφθαλμού επειδή εκτίθεται στο εξωτερικό περιβάλλον είναι εύκολα προσβάσιμη σε μολυσματικούς παράγοντες [13], οι οποίοι δύναται να προσβάλουν οποιοδήποτε τμήμα του οφθαλμού [13, 14, 15]. Ορισμένες λοιμώξεις επηρεάζουν σημαντικές δομές του οφθαλμού, με επακόλουθο την εμφάνιση διάφορων επιπλοκών και την καταστροφή της οπτικής λειτουργίας [15]. Παράδειγμα αποτελεί η κερατίτιδα, δηλαδή η φλεγμονή του κερατοειδή χιτώνα, ο οποίος είναι διαφανής και αποτελεί το πρόσθιο τμήμα του σκληρού χιτώνα (εξωτερικός χιτώνας και αντιστοιχεί στο άσπρο του οφθαλμού) (βλ. Εικ 1.1) [13,14].



Εικόνα 1.1: Ανατομία οφθαλμού.

<https://www.unilens.gr/el/matia-orasi/2016-05-08-13-44-44.html>

Σε υγιή ανοσοεπαρκή άτομα η λοίμωξη του κερατοειδούς είναι σπάνια λόγω των φυσικών αμυντικών μηχανισμών που διαθέτει ο ίδιος ο οφθαλμός [13, 14, 15]. Εντούτοις, ορισμένοι παράγοντες διαταράσσουν τους φυσικούς αμυντικούς φραγμούς επιτρέποντας την εισβολή μικροβίων στον κερατοειδή. Σε αυτούς τους παράγοντες προδιάθεσης συγκαταλέγονται: α) η συστηματική και κακή χρήση φακών επαφής, β) η ύπαρξη τραύματος ή εγκαύματος στον κερατοειδή, γ) η μειωμένη παραγωγή δακρύων, δ) υποκείμενα χρόνια νοσήματα όπως ο διαβήτης και ε) η λήψη ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Ο πιο κοινός προδιαθεσικός παράγοντας, ο οποίος οδηγεί σε έλκος του κερατοειδούς, είναι η χρήση των φακών επαφής [15,16, 17, 18].

Γενικά, τα αίτια της κερατίτιδας μπορεί να είναι λοιμώδη ή μη λοιμώδη. Έτσι, οι κερατίτιδες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στις μικροβιακές κερατίτιδες (λοιμώδους αιτιολογίας) και στις άσηπτες κερατίτιδες (μη λοιμώδους αιτιολογίας) [13, 14].

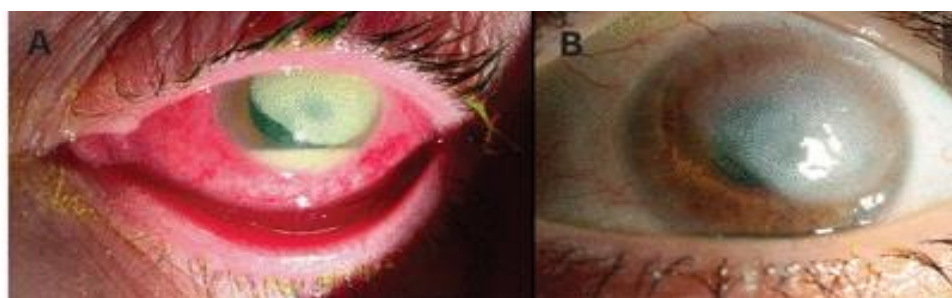
Οι κερατίτιδες λοιμώδους αιτιολογίας συνήθως σχετίζονται με την προσβολή από βακτήρια αλλά μπορεί να προκληθούν και από μύκητες, ιούς και παράσιτα. Στην Εικ. 1.2 απεικονίζεται η κλινική εικόνα του έλκους του κερατοειδούς από διάφορους μολυσματικούς παράγοντες. Σχετικά, με την βακτηριακή κερατίτιδα μπορεί να οφείλεται τόσο σε Gram-θετικά, όπως *Staphylococcus epidermidis* και *Streptococcus pneumoniae*, όσο και σε Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως *Pseudomonas aeruginosa* (βλ. Εικ. 1.3) και *Serratia marcescens*. Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα πιο κοινά βακτήρια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη κερατίτιδας. Η βακτηριακή κερατίτιδα είναι λοίμωξη ιδιαίτερα απειλητική για την όραση και χωρίς την έγκαιρη χορήγηση κατάλληλης θεραπείας μπορεί να οδηγήσει σε διάτρηση του κερατοειδούς. Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για όλες τις μορφές της μικροβιακής κερατίτιδας και ιδίως της λοίμωξης από *Pseudomonas aeruginosa* και από πρωτόζωα, όπως η Ακανθαμοιβάδα, είναι η παρατεταμένη ολονύκτια χρήση μαλακών φακών επαφής [15, 16, 17, 19].

Στα συμπτώματα της βακτηριακής κερατίτιδας περιλαμβάνονται ο οξύς πόνος, ελάττωση της όρασης, παραγωγή πύου και άλλων εκκρίσεων, υπεραιμία του επιπεφυκότα και η φωτοφοβία. Ο ρυθμός προοδευτικής επιδείνωσης των συμπτωμάτων εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη του υπεύθυνου παθογόνου [14, 15, 20].



Εικόνα 1.2: Κλινική εικόνα του έλκους του κερατοειδούς λοιμώδους αιτιολογίας.

<https://ophthalmiatros-pavlopoulos.gr/>



Εικόνα 1.3: Α) Έλκος κερατοειδούς από *Pseudomonas aeruginosa*, Β) Βελτιωμένη κλινική εικόνα μετά από χορήγηση κατάλληλης θεραπείας με αντιβιοτικά

<https://www.cmaj.ca/content/190/2/E54>

Οι άσηπτες κερατίτιδες μπορεί να σχετίζονται με τραυματισμούς, με την έκθεση σε χημικούς παράγοντες ή σε υπεριώδη ακτινοβολία, σε διαταραχές της νεύρωσης του κερατοειδούς (νευροτροφική κερατίτιδα) καθώς και σε αυτοάνοσα νοσήματα (όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα και συστηματικός ερυθηματώδης λύκος). Στην Εικ.1.4 παρουσιάζεται η κλινική εικόνα της άσηπτης κερατίτιδας [13,14, 15, 20].



Εικόνα 1.4: Κλινική εικόνα άσηπτης κερατίτιδας

<https://ophthalmiatros-pavlopoulos.gr/>

Πίνακας 1.1 Αίτια Βακτηριακής Κερατίτιδας

Staphylococcus epidermidis, *S.aureus*

Streptococcus spp. (*S. pneumoniae*, α-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι και μη αιμολυτικοί)

Bacillus cereus

Listeria monocytogenes

Corynebacterium spp.

Moraxella spp.

Pseudomonas aeruginosa (το πιο κοινό αίτιο στους χρήστες φακών επαφής)

1.3 Βιοϋμένια

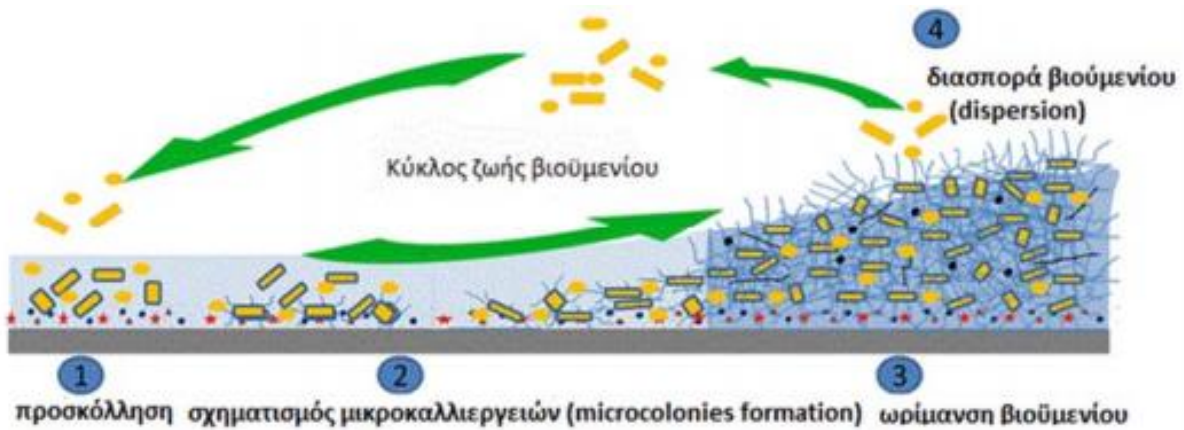
Στο περιβάλλον, τα βακτήρια διαβιούν είτε ανεξάρτητα ως ελεύθερα κύτταρα (πλαγκτονικά κύτταρα) είτε μέσα σε βιομεμβράνες. Οι βιομεμβράνες ή βιοϋμένια (biofilms), είναι κοινότητες βακτηρίων προσκολλημένων σε κάποια έμβια ή μη επιφάνεια, που έρχεται σε επαφή με νερό ή και με άλλα υγρά. Οι θήκες φακών επαφής αποτελούν παράδειγμα τέτοιων επιφανειών που επιτρέπουν την προσκόλληση βακτηρίων και τον σχηματισμό βιοϋμενίου [4].

Τα κύρια συστατικά που συνιστούν μια βιομεμβράνη είναι τα μικροβιακά κύτταρα, το στρώμα του εξωκυττάρου πολυμερούς (γλυκοκάλυκας), που παράγεται και εκκρίνεται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς και η επιφάνεια προσκόλλησης. Ο σχηματισμός βιομεμβρανών περιλαμβάνει 4 στάδια (βλ. Εικ. 1.5): α) προσκόλληση των ελεύθερων αιρούμενων βακτηρίων σε μια επιφάνεια, β) έκκριση πολυμερούς και σχηματισμός μικροαποικιών, γ) ώριμη βιομεμβράνη και δ) αποκόλληση και διασπορά των βακτηρίων [4, 12, 21].

Οι βιομεμβράνες χαρακτηρίζονται από υψηλή μικροβιακή ετερογένεια και μεγάλη πυκνότητα μικροοργανισμών, γεγονός που ευνοεί την μεταξύ τους επικοινωνία και επομένως την ανταλλαγή γενετικού υλικού. Έτσι, τα βακτήρια που ζουν μέσα σε αυτές αποκτούν νέες ιδιότητες, μερικές από τις οποίες δεν παρατηρούνται στις πλαγκτονικές μορφές. Αυτά τα νέα χαρακτηριστικά μπορεί να είναι ο διαφορετικός ρυθμός ανάπτυξης και η αυξημένη αντοχή στα απορροπαντικά και στα αντιβιοτικά [12, 13, 14, 21].

Ορισμένοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν εντονότερη τάση δημιουργίας βιοϋμενίων. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι τα βακτήρια *Streptococcus pneumoniae*, οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, ο *Staphylococcus aureus* και *Staph. epidermidis*, η *Pseudomonas aeruginosa*, το *Escherichia coli* και ο μύκητας *Candida albicans* [4, 12, 21].

Υπολογίζεται πως το 65% των λοιμώξεων του ανθρώπου άνθρωπο οφείλεται σε βακτήρια που ασκούν λοιμογόνο δράση μέσω των βιομεμβρανών. Ορισμένα βακτήρια, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, η *Klebsiella pneumoniae* και *Staphylococcus aureus* συνδέονται με την ανάπτυξη βιομεμβρανών σε βιοϊατρικά υλικά και εμφυτεύματα, όπως σε προσθετικές βαλβίδες, ουροκαθετήρες, ορθοπεδικά εμφυτεύματα, συσκευές μηχανικής υποστήριξης και φακούς επαφής, γεγονός που εκθέτει σε υψηλό κίνδυνο τον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός βιομεμβράνης σε φακούς επαφής και στις θήκες αποθήκευσης αυτών, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη κερατίτιδας που σχετίζεται με χρήση φακών (contact lens, CL-related keratitis) [4, 14, 15, 17].



Εικόνα 1.5: Στάδια σχηματισμού των βιομεμβρανών

https://hms.org.gr/wp-content/uploads/2016/10/Acta-Microbiologica_Volume59_Issue3_2014.pdf

1.4 Γενικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Ps. aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα Gram-αρνητικό ραβδοειδές κινητό βακτήριο. Μερικά στελέχη διαθέτουν ένα επιπλέον εξωτερικό πολυσακχαριδικό έλυτρο. Το βακτήριο εντοπίζεται τόσο σε περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα, όπως νερό, χώμα και λύμα, όσο και σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα όπως καθετήρες, νεροχύτες, συσκευές αερισμού κ.α.. Στη φύση, το βακτήριο *Ps. aeruginosa* απαντάται είτε ως ελεύθερο αιωρούμενο βακτήριο είτε μέσα σε βιομεμβράνες, καθώς διαθέτει εξειδικευμένους μηχανισμούς που καθιστούν εφικτή την αρχική επαφή και προσκόλληση σε επιφάνειες και την ανάπτυξη του μέσα σε αυτές τις βακτηριακές κοινωνίες [22]. Γενικά, δεν ανήκει στη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό ανθρώπων είναι φορείς και για αυτό η ανίχνευση του συγκεκριμένου βακτηρίου σε δείγματα κοπράνων ή στον ρινοφάρυγγα και στο δέρμα δεν είναι καθόλου ασυνήθιστη.

Μολονότι είναι αερόβιο βακτήριο και δεν συμμετέχει σε διαδικασίες ζύμωσης, μπορεί να αναπτυχθεί και σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου όταν στο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται υπάρχει διαθεσιμότητα σε νιτρικά [22, 23]. Όπως όλα τα είδη του γένους, έχει πολύ απλές διατροφικές απαιτήσεις. Οι μεταβολικές του διαδικασίες χαρακτηρίζονται από μεγάλη προσαρμοστικότητα. Τα περισσότερα στελέχη του είδους παράγουν τα ένζυμα οξειδάση και καταλάση και δεν διασπούν την λακτόζη. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι οι 37°C, αλλά είναι ικανό να αναπτυχθεί και σε υψηλότερες θερμοκρασίες, όπως στους 42°C [24]. Αναπτύσσεται άριστα σε υγρά περιβάλλοντα και εμφανίζει ανθεκτικότητα

σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και χρωστικών, σε ήπια αντισηπτικά, αλλά και στα περισσότερα κοινά αντιβιοτικά [23, 25]

Οι αποικίες του βακτηρίου *Ps. aeruginosa* εμφανίζουν χαρακτηριστικό χρώμα στο θρεπτικό μέσο όπου καλλιεργούνται, γεγονός που οφείλεται στις διαλυτές χρωστικές ουσίες που εκκρίνει. Οι χρωστικές αυτές είναι η πυοκυανίνη, η οποία δίνει το χαρακτηριστικό μπλε-πράσινο χρώμα στις αποικίες και η πυοβερδίνη (pyoverdine), η οποία είναι φθορίζουσα χρωστική και χαρίζει στις αποικίες κίτρινο-πράσινο χρώμα και έντονο φθορισμό. Ένα άλλο σημαντικό γνώρισμα της *Ps. aeruginosa* είναι η ιδιαίτερη οσμή (γιασεμί) που αναδύουν οι αποικίες της [14, 22].

Όλα τα παραπάνω δηλαδή, η ικανότητα ανάπτυξης στους 42°C, ο φθορισμός στο υπεριώδες φως, η χαρακτηριστική οσμή της καλλιέργειας και η παραγωγή μπλε-πράσινης χρωστικής διευκολύνουν την διαδικασία ταυτοποίησης του είδους [14, 22, 24].

Οι συνήθεις αποικίες είναι επίπεδες με ανώμαλα άκρα και έχουν την τάση να απλώνονται σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Η μορφολογία των αποικιών δεν είναι πάντοτε η τυπική. Υπάρχουν 6 τύποι αποικιών: οι λείες (smooth), οι ξηρές (rough), οι βλενώδεις (mucoid), οι ζελατινώδεις, οι μικρές και οι έχουσες τη μορφή του κολοβακτηριδίου. [22, 24].

Το βακτήριο είναι εξαιρετικά ανθεκτικό σε αντιβιοτικά, που χρησιμοποιούνται ευρέως κατά την κλινική πράξη και για αυτό θεωρείται επικίνδυνο και θανατηφόρο ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο. Η ανθεκτικότητά του οφείλεται στην εξωτερική λιποπολυσακχαριδική μεμβράνη, στους εγγενείς μηχανισμούς αντοχής που διαθέτει, αλλά και στην ικανότητά του να προσλαμβάνει νέους μηχανισμούς μέσω των κινητών γενετικών μονάδων. Επίσης, η ικανότητά του να αναπτύσσεται με τη δημιουργία βιολογικού υμενίου, το καθιστά αδιαπέραστο στις θεραπευτικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών [24].

1.5 Λοιμώξεις από το βακτήριο *Ps. aeruginosa*

Το βακτήριο *Ps. aeruginosa* είναι ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός, που συνήθως δεν προκαλεί ασθένειες σε υγιείς. Ωστόσο, δύναται να προκαλέσει θανατηφόρες λοιμώξεις σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα (όπως καρκινοπαθείς, άτομα με ουδετεροπενία ή άτομα με AIDS), σε ασθενείς με σοβαρά εγκαύματα και σοβαρές δερματικές βλάβες καθώς και σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση [13, 14].

Η *Ps. aeruginosa* ευδοκίμει τόσο στη κοινότητα όσο και στο νοσοκομειακό περιβάλλον, γεγονός που οφείλεται στις ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις και στην ικανότητα ανάπτυξης σε μεγάλο εύρος φυσικών συνθηκών [13, 14, 24].

Στην κοινότητα, εντοπίζεται κυρίως σε κολυμβητικές δεξαμενές, υδρομασάζ, διαλύματα και θήκες φακών επαφής, οικιακούς υγραντήρες, χώμα και λαχανικά [26]. Οι νοσηλευόμενοι ασθενείς μπορεί να προσβληθούν από το βακτήριο είτε κατά την εισαγωγή τους ή κατά τη διάρκεια παραμονής τους στο νοσοκομείο. Το βακτήριο μπορεί να απομονωθεί από σχεδόν οποιαδήποτε πηγή μέσα στα νοσοκομεία όπως από αντισηπτικά, σαπούνια, νεροχύτες, ιατρικό εξοπλισμό και πισίνες φυσιοθεραπείας και υδροθεραπείας [26, 27].

Οι πιο σοβαρές λοιμώξεις από το βακτήριο παρατηρούνται σε εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης και περιλαμβάνουν: α) λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού, που σχετίζονται κυρίως με τη χρήση μολυσμένων αναπνευστήρων και μπορεί να εξελιχθούν σε νεκρωτική πνευμονία, β) λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, που παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς με ουροκαθετήρα, γ) λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος που μπορεί να οδηγήσουν σε θανατηφόρο σηψαιμία, δ) μηνιγγίτιδα όταν εισαχθεί ιατρογενώς στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό κατά την οσφυονωτιαία παρακέντηση, ε) δερματικές λοιμώξεις στα σημεία εγκαυμάτων και χειρουργικών τραυμάτων. Γενικά, η *Ps. aeruginosa* ευθύνεται για το 16% της νοσοκομειακής πνευμονίας, το 12% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, το 8% λοιμώξεων χειρουργικών τραυμάτων και το 10% περιστατικών σηψαιμίας [13, 14].

Στην κοινότητα, συχνά προκαλεί ωτίτιδες, όπως η ήπια εξωτερική ωτίτιδα των κολυμβητών που μπορεί να οδηγήσει σε κακοήθη εξωτερική ωτίτιδα σε διαβητικούς ασθενείς. Άλλες λοιμώξεις της κοινότητας περιλαμβάνουν την ελκώδη κερατίτιδα, που συνήθως σχετίζεται με τη χρήση φακών επαφής, διάφορες δερματικές λοιμώξεις, όπως θυλακίτιδα, μολύνσεις των ποδιών και το σύνδρομο του πράσινου νυχιού μετά από έκθεση σε πηγές νερού όπως υδρομασάζ, τζακούζι και πισίνες και τη σηπτική αρθρίτιδα σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών [13, 14].

1.6 Μηχανισμοί αντοχής στο βακτήριο *Ps. aeruginosa*

Οι λοιμώξεις από το βακτήριο *Ps. aeruginosa* είναι ιδιαίτερα σοβαρές και δεν θεραπεύονται εύκολα. Αυτό οφείλεται στην παρουσία ενός συνόλου μηχανισμών που την καθιστούν ανθεκτική στα περισσότερα αντιβιοτικά [26, 27].

Γενικά, η *Ps. aeruginosa* από τη φύση της εμφανίζει αντοχή σε κάποιες κατηγορίες αντιβιοτικών, χάρη στην ύπαρξη εγγενών μηχανισμών αντοχής. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν:

A) Την απώλεια πορινών (Loss of oprD) που σχετίζεται με τη μειωμένη διαπερατότητα του αντιβιοτικού.

B) Την παραγωγή χρωμοσωμικής κεφαλοσπορινάσης AmpC, δηλαδή ενός ενζύμου που εξουδετερώνει τη δράση των κεφαλοσπορινών. Το γονίδιο του ενζύμου αυτού εδράζεται στο βασικό βακτηριακό χρωμόσωμα (εξ ου και ο όρος χρωμοσωμική)

Γ) Την υπερ-έκφραση αντλιών εκροής (efflux pumps). Λόγω της υπερβολικής παραγωγής των συγκεκριμένων πρωτεϊνών-αντλιών, τα αντιβιοτικά αποβάλλονται πολύ γρήγορα από το βακτήριο πριν προλάβουν να δράσουν [26, 28].

Εντούτοις, η *Ps. aeruginosa* εκτός από τους εγγενείς μηχανισμούς διαθέτει και ένα πλήθος νέων επίκτητων στοιχείων αντοχής. Η επίκτητη αντοχή συνδέεται με την πρόσληψη εξωγενών γενετικών κινητών μονάδων, όπως τα πλασμίδια, τα οποία περιέχουν γονίδια αντοχής. Αυτά τα γενετικά στοιχεία μεταφέρονται οριζοντίως από ένα βακτήριο στο άλλο, συνήθως μέσω της διαδικασίας της σύζευξης. Παράδειγμα επίκτητης αντοχής είναι η παρουσία πλασμιδιακών γονιδίων καρβαπενεμασών, δηλαδή ενζύμων που υδρολύουν τις καρβαπενέμες [28, 29].

Επομένως, οι ποικίλοι μηχανισμοί αντοχής, τόσο οι εγγενείς όσο και οι επίκτητοι, του βακτηρίου του προσδίνουν την ικανότητα να εμφανίζει αντοχή σε ένα πλήθος αντιβιοτικών, γεγονός που δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο την επιτυχή θεραπεία της λοίμωξης. [26, 28, 29].

Η εμφάνιση πολύ-ανθεκτικών στελεχών *Ps. aeruginosa* (Multi Drug Resistant, MDR) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα Δημόσιας Υγείας, τόσο στην Ελλάδα, όσο και στον υπόλοιπο κόσμο [30, 31]. Ο πολύ-ανθεκτικός φαινότυπος του βακτηρίου οφείλεται α) στην απόκτηση πλασμιδιακών γονιδίων αντοχής, β) στο συνδυασμό επίκτητων και εγγενών μηχανισμών αντοχής, γ) στη συσσώρευση πολλαπλών χρωμοσωμικών αλλαγών με την πάροδο του χρόνου δ) σε μεταλλάξεις που οδηγούν στην υπερέκφραση ενός μηχανισμού αντοχής σε πολλές αντιμικροβιακές ουσίες π.χ. μιας αντλίας εκροής [26, 28].

Η *Ps. aeruginosa* έχει εγγενή αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων των μακρολίδων, των τετρακυκλίνων, της τριμεθοπρίμης/σουλφαμεθοξαζόλης και των

περισσότερων φθοριοκινολονών. Ωστόσο, τα στελέχη άγριου τύπου του βακτηρίου εμφανίζουν ευαισθησία στις καρβοξυπενικυλλίνες (τικαρκιλίνη), ουρεΐδοπενικιλίνες (πιπερακιλλίνη), στους συνδυασμούς β-λακτάμων/ αναστολείς β-λακταμάσης (πιπερακιλλίνη/ ταζοβακτάμη, τικαρκιλίνη/ κλαβουλανικό), στις κεφαλοσπορίνες τρίτης και τέταρτης γενιάς (όπως κεφεπίμη, κεφταζιδίμη και κεφοπεραζόνη), στις αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, τομπραμυκίνη και αμικακίνη), στις μονοβακτάμες (αζτρεονάμη), σε μερικές φθοριοκινολόνες (όπως σιπροφλοξασίνη), στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη) και στις πολυμυξίνες (κολιστίνη) [32, 33].

Κεφάλαιο 2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Θρεπτικά υποστρώματα και αντιδραστήρια

2.1.1 Θρεπτικός Ζυμός- Nutrient broth (LAB068, LAB M™)

Μη εκλεκτικό υλικό για γενική χρήση, Περιέχει (g/L): εκχύλισμα κρέατος 1.0, εκχύλισμα ζύμης 2.0, πεπτόνη 5.0, χλωριούχο νάτριο 5.0.

13 gr διαλύονται σε 1 L απιονισμένου νερού, ακολουθεί καλή ανάδευση και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

2.1.2 Εκλεκτικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα – Pseudomonas Agar Base/CN agar (LAB108, LAB M™)

Περιέχει (g/L): Πεπτόνη από ζελατίνη 16.0, υδρολυμένη καζεΐνη 10.0, θειικό νάτριο (άνυδρο) K₂SO₄ 10.0, χλωριούχο μαγνήσιο (άνυδρο) MgCl₂ 1.4, γλυκερόλη 10 ml, άγαρ 11.0-18.0.

48.4 gr διαλύονται 1 L απιονισμένου νερού και ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Στο διάλυμα, αφού κρυώσει (45-50 °C), προστίθενται 2ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού που περιέχουν CN-συμπλήρωμα (Cetrimide 0.2 gr, Nalidixic Acid 0.015 gr). Τελικό pH 7.1.

2.1.3 Εκλεκτικό/Διαφοροποιητικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey agar No.2

(CM0109, OXOID)

Περιέχει (gm/L): πεπτόνη 20.0, λακτόζη 10.0, χολικά άλατα No.2 1.5, χλωριούχο νάτριο 5.0, ουδέτερο ερυθρό 0.05, κρυσταλλικό ιώδες 0.001, άγαρ 15.0. pH στο 7.1±0.2.

51.5 gr διαλύονται σε 1 L απιονισμένου νερού και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

2.1.4 Γενικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα – Nutrient Agar (NCM0033A, NEOGEN)

Περιέχει (g/L): πεπτόνη 5.0, εκχύλισμα κρέατος 3.0, χλωριούχο νάτριο 8.0, άγαρ 12.0.

pH στο 7.3±0.2.

28.0 gr διαλύονται σε 1 L απιονισμένου νερού και στη συνέχεια ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

2.1.5 Θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton agar για έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας

(LAB039, LAB M™)

Περιέχει (g/L): beef infusion solids 2.0, όξινη υδρολυμένη καζεΐνη 17.5, άμυλο 1.5, άγαρ No.1 17.0. pH στο 7.3±0.1.

38 gr διαλύονται σε 1 L απιονισμένου νερού και στη συνέχεια ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

2.1.6 Θρεπτικό υπόστρωμα φύλαξης στελεχών στους -80°C, Brain Heart + 20% glycerol (CM1135, OXOID)

Περιέχει σε (g/L): brain heart infusion solids 17.5, γλυκόζη 10.0, χλωριούχο νάτριο 5.0 και όξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄) 2.5.

37.0 g διαλύονται σε 1 L απιονισμένου νερού και ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Μετά την αποστείρωση προστίθεται 20% γλυκερόλη.

2.1.7 Αντιδραστήριο Οξειδάσης (BD BBL™): Oxidase Reagent Droppers ready to use

2.2 Συλλογή δειγμάτων

Στο εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας (EMMA) του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, στάλθηκαν συνολικά 82 θήκες φακών επαφής από το Εργαστήριο Οπτικής Οπτομετρίας. Οι θήκες συνοδευόμενες από ανώνυμα παραπεμπτικά, υποβλήθηκαν σε μικροβιακό έλεγχο για την παρουσία του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3 Πειραματική διαδικασία απομόνωσης στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*

Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η πειραματική διαδικασία.

Μέρα 1^η

Ενοφθαλμισμός σε Nutrient Broth (θρεπτικός ζωμός):

- Συλλογή 250 μl υγρού της θήκης με χρήση πιπέτας και επιχρίσματος από τα τοιχώματα της θήκης με χρήση βαμβακοφόρου.
- Ενοφθαλμισμός του περιεχομένου σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει Nutrient Broth
- Ολονύκτια επώαση στους 37 °C

Μέρα 2^η

Έλεγχος θολερότητας

Τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν θολερότητα, μελετήθηκαν περαιτέρω. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε:

- Εμβάπτιση κρικοφόρου σπειροειδούς εντός του δοκιμαστικού σωλήνα
- Επίστρωση σε MacConkey και σε *Pseudomonas Agar Base*
- Ολονύκτια επώαση στους 37 °C

Μέρα 3^η

A) Ανάπτυξη αποικιών στο Pseudomonas Agar Base:

- Λήψη μονής αποικίας και επίστρωση σε Nutrient Agar
- Ολονύκτια επώαση στους 37 °C

B) Ανάπτυξη άχρωμων αποικιών στο MacConkey Agar:

- Λήψη μονής αποικίας και επίστρωση σε Nutrient Agar
- Ολονύκτια επώαση στους 37 °C

Μέρα 4^η

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν σε Nutrient Agar υποβλήθηκαν σε δοκιμή οξειδάσης ως εξής:

- Χρήση διηθητικού χαρτιού, το οποίο εμποτίζεται με το αντιδραστήριο της οξειδάσης
- Μεταφορά μικρής ποσότητας κυττάρων

Η θετική αντίδραση οξειδάσης εκτιμάται με την αλλαγή χρώματος (από άχρωμο σε μωβ), μετά από 30 sec.

Τα στελέχη που έδωσαν θετική αντίδραση οξειδάσης φυλάχθηκαν σε κατάλληλο υλικό (Brain Heart Broth Solution/Glycerol) στους -80 °C.

2.4 Έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Τα 7 επιβεβαιωμένα στελέχη *Ps. aeruginosa*, που απομονώθηκαν από τις θήκες των φακών επαφής, ελέγχθηκαν για τα επίπεδα ευαισθησίας, σε 11 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, έξι διαφορετικών κατηγοριών (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονομπακτάμες, αμινογλυκοσίδες, κινολόνες), με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ, σύμφωνα με τις οδηγίες της πρότυπης μεθόδου του 'The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing' (EUCAST).

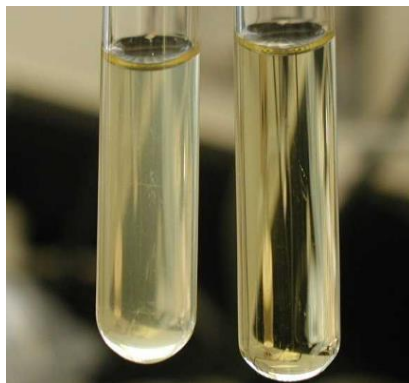
Για την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε Nutrient agar και ακολούθησε επίστρωση αυτού στο υλικό Mueller-Hinton agar.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και ο χαρακτηρισμός του υπό εξέταση στελέχους ως ευαίσθητο ή ανθεκτικό στα ελεγχόμενα αντιβιοτικά γίνεται σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας και τα γενικά σχόλια που παρέχονται στο European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing -EUCAST: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0.

Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα επώασης σε Nutrient Broth

Ύστερα από ολονύκτια επώαση σε Nutrient Broth στους 37 °C, από τα 82 δείγματα τα οποία μόνο τα 26 εμφάνισαν θολερότητα όπως φαίνεται στην Εικ. 3.1.



Εικόνα 3.1: Η ανάπτυξη μικροβίων σε Nutrient Broth εκτιμάται με την ανάπτυξη θολερότητας. Στον δοκιμαστικό σωλήνα αριστερά παρατηρείται θολερότητα ενώ στον σωλήνα δεξιά το υλικό είναι διαυγές (Από Εργαστήριο E.M.M.A)

3.2 Αποτελέσματα επίστρωση σε MacConkey και σε Pseudomonas Agar Base

Τα 26 δείγματα που ανέπτυξαν θολερότητα επιστρώθηκαν σε δύο διαφορετικά εκλεκτικά θρεπτικά υλικά:

α) σε MacConkey Agar που επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των Gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του βακτηρίου *Ps. aeruginosa*

β) σε Pseudomonas Agar Base, που επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*.

Από τα 26 δείγματα μόνο τα 17 αναπτύχθηκαν στα παραπάνω θρεπτικά υλικά. Συγκεκριμένα, 14 αναπτύχθηκαν στα δυο στερεά θρεπτικά υποστρώματα *Pseudomonas agar base* και *MacConkey* και 3 μόνο στο *MacConkey agar*.

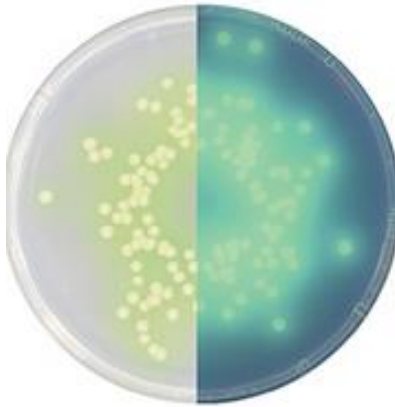
Τα 14 δείγματα, τα οποία εμφάνισαν ανάπτυξη στο *Pseudomonas agar base* υποβλήθηκαν σε

περαιτέρω βιοχημική ταυτοποίηση, με την δοκιμασία οξειδάσης.

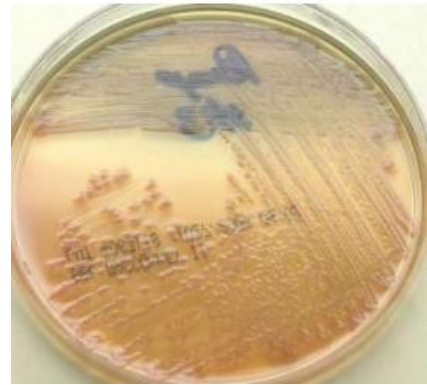
Τα 3 δείγματα που αναπτύχθηκαν μόνο σε *MacConkey* αποκλείστηκαν από την έρευνα, καθώς βάσει των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (κόκκινες αποικίες αντί για άχρωμες), δεν ανήκαν στο είδος *Ps. aeruginosa*. Πιθανότατα οι συγκεκριμένες θήκες ήταν επιμολυσμένες με κάποιο άλλο Gram-αρνητικό βακτήριο.

Τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν θολερότητα αλλά δεν αναπτύχθηκαν στο *MacConkey*, πιθανότατα ήταν επιμολυσμένες με Gram+ βακτήριο, όπως βακτήρια του γένους *Staphylococcus* ή *Streptococcus* τα οποία αποτελούν και τη φυσιολογική χλωρίδα των οφθαλμών.

Στην Εικ.3.2 απεικονίζεται μια τυπική αποικία *Ps. aeruginosa* σε *Pseudomonas agar base*, η οποία παράγει φθορισμό όταν τοποθετηθεί σε λάμπα UV. Στην Εικ.3.3 παρουσιάζονται αποικίες *Ps. aeruginosa* σε *MacConkey Agar*. Όπως φαίνεται οι αποικίες είναι άχρωμες και προκαλούν αλλοίωση στο χρώμα του θρεπτικού υλικού, λόγω των χρωστικών ουσιών που εκκρίνουν.



Εικόνα 3.2: Φθορίζουσες αποικίες *Ps. aeruginosa* σε Pseudomonas agar base
<http://www.labm.com/organisms/pseudomonas/?pi=24>



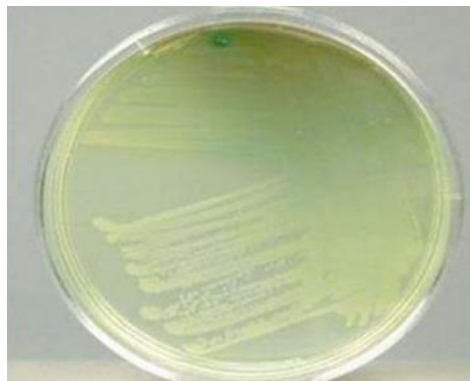
Εικόνα 3.3: Αχρωμες αποικίες *Ps. aeruginosa* σε MacConkey Agar. (Από Εργαστήριο Ε.Μ.Μ.Α.)

3.3 Αποτελέσματα δοκιμασίας οξειδάσης

Τα 14 δείγματα, τα οποία εμφάνισαν ανάπτυξη στο Pseudomonas agar base, αφού πρώτα καλλιεργήθηκαν σε Nutrient Agar (βλ. Εικ.3.4) υποβλήθηκαν στην δοκιμασία οξειδάσης. Η συγκεκριμένη βιοχημική μέθοδος ταυτοποίησης, ελέγχει αν ο μικροοργανισμός διαθέτει το ένζυμο cytochrome oxidase, απαραίτητο στην μετατροπή



Η θετική αντίδραση οξειδάσης εκτιμάται με την αλλαγή χρώματος από άχρωμο σε μπλε. Τα δείγματα με θετική δοκιμασία οξειδάσης είναι *Pseudomonas aeruginosa*. Από τα 14 μόνα τα 7 ήταν θετικά για την δοκιμασία οξειδάσης. Συμπερασματικά, από τις 82 θήκες φακών επαφής μόνο οι 7 ήταν θετικές για την ανάπτυξη *Pseudomonas aeruginosa*.



Εικόνα 3.4: Αποικίες *Ps. aeruginosa* σε Nutrient agar (Από Εργαστήριο Ε.Μ.Μ.Α.)

3.4 Αποτελέσματα επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Στον παρακάτω Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελεσμάτων των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, όπως προέκυψαν από τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (αντιβιογράμμα- μέθοδος Kirby- Bauer). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες και τα κλινικά όρια του EUCAST, κανένα στέλεχος δεν θεωρείται ευαίσθητο. Το στέλεχος 13 χαρακτηρίστηκε ως πολύ-ανθεκτικό καθώς εμφάνισε αντοχή σε όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών, ακόμα και στις καρβαπενέμες (MEM, IMP). Άλλα στελέχη με σημαντικές αντοχές ήταν το 21 και το 23. Επίσης, παρατηρήθηκε πως η πλειοψηφία των στελεχών εμφάνισε αντοχή σε σιπροφλοξασίνη (CIP) και τικαρκιλίνη (TIC).

Πίνακας 3.1: Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

| Στέλεχος | Πενικιλίνες | | | Κεφαλοσπορίνες | | Καρβαπενέμες | | Μονοπακτάμες | Αμινογλυκοσίδες | | Κινολόνες | Αντοχές |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|
| | 1. PIP | 2. TIC | 3. TZP | 4. CAZ | 5. FEP | 6. MEM | 7. IMP | 8. ATM | 9. NN | 10. AN | 11. CIP | |
| | S ≥ 50 R <18 | S ≥ 50 R <18 | S ≥ 50 R <18 | S ≥ 50 R <17 | S ≥ 50 R <21 | S ≥ 24 R <18 | S ≥ 50 R <20 | S ≥ 50 R <18 | S ≥ 18 R <18 | S ≥ 15 R <15 | S ≥ 50 R <26 | |
| 13 | 6 | 6 | 18 | 6 | 12 | 16 | 18 | 6 | 6 | 6 | 6 | PIP, TIC, CAZ, FEP, MEM, IMP, ATM, NN, AN, CIP |
| 21 | 30 | 22 | 30 | 26 | 20 | 30 | 28 | 14 | 22 | 24 | 16 | FEP, ATM, CIP |
| 23 | 10 | 6 | 10 | 28 | 16 | 28 | 28 | 24 | 18 | 20 | 18 | PIP, TIC, TZP, FEP, CIP |
| 24 | 29 | 14 | 30 | 32 | 26 | 30 | 26 | 28 | 18 | 20 | 26 | TIC |
| 25 | 29 | 20 | 30 | 32 | 26 | 30 | 26 | 28 | 18 | 20 | 26 | - |
| 75 | 30 | 16 | 30 | 30 | 26 | 28 | 28 | 26 | 20 | 20 | 30 | TIC |
| 77 | 26 | 14 | 26 | 28 | 26 | 26 | 22 | 28 | 18 | 20 | 24 | TIC, CIP |

PIP: piperacillin (πιπερακιλλίνη), TIC: ticarcillin (τικαρκιλίνη), TZP: piperacillin-tazobactam (πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη), FEP: cefepime (κεφεπίμη), CAZ: ceftazidime (κεφταζιδίμη), IMP: imipenem (ιμιπενέμη), MEM: meropenem (μεροπενέμη), ATM: aztreonam (αζτρεονάμη), NN: tobramycin (τιμπραμικίνη), AN: amikacin (αμικασίνη), CIP: ciprofloxacin (σιπροφλοξασίνη)

3.5 Συσχέτιση μικροβιολογικών ευρημάτων και διάρκεια χρήσης των θηκών φακών επαφής

Τα άτομα-χρήστες φακών επαφής, που συμμετείχαν εθελοντικά στην συγκεκριμένη έρευνα, είχαν μέσο όρο ηλικίας 22 έτη και η πλειοψηφία αυτών ήταν γυναίκες (52/82).

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν Mac Conkey και Pseudomonas Agar Base επιτρέπουν την ανάπτυξη Gram-αρνητικών βακτηρίων. Επομένως τα 17 δείγματα, που εμφάνισαν αποικίες στα παραπάνω θρεπτικά υλικά, ανεξάρτητα από το αν ήταν θετικά ή όχι για *Ps. aeruginosa*, ήταν επιμολυσμένα με κάποιο Gram-αρνητικό βακτήριο. Δεδομένου ότι η φυσιολογική χλωρίδα του οφθαλμού απαρτίζεται κυρίως από μη παθογόνα είδη *Staphylococcus* και *Streptococcus*, το παραπάνω εύρημα θεωρείται πολύ σημαντικό και αποδεικνύει τη σημασία της τήρησης των μέτρων ατομικής υγιεινής.

Από τα 17 δείγματα που αναπτύχθηκαν, τα 8 προέρχονταν από θήκες που είχαν χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο του επιτρεπτού. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος χρήσης αυτών των θηκών ήταν 6 μήνες. Από αυτά τα 8 δείγματα τα 3 ήταν θετικά για *Ps. aeruginosa*.

Επίσης, από τα 17 δείγματα θηκών που εμφάνισαν αποικίες στα προαναφερθέντα θρεπτικά υποστρώματα, τα 4 ανήκαν σε χρήστες με οφθαλμολογικά σημεία. Συγκεκριμένα, το ένα δείγμα θήκης (No 24) που βρέθηκε θετικό για *Ps. aeruginosa*, άνηκε σε άτομο που είχε διαγνωστεί με θολή όραση και κερατίδα. Τα άλλα 3 δείγματα θηκών (No 50, 60 και 66) που είχαν αναπτυχθεί σε MacConkey, ανήκαν σε άτομα με επιπεφυκίτιδα, διήθηση κερατοειδούς και στίξη κερατοειδούς, αντίστοιχα. Στον **Πίνακα 3.2** παρουσιάζονται τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά για *Ps. aeruginosa* μαζί με τα επιδημιολογικά δεδομένα.

Στον **Πίνακα 3.3** παρατίθενται όλα τα αποτελέσματα.

Πίνακας 3.2 Στελέχη *Ps. aeruginosa* που απομονώθηκαν από θήκες φακών επαφής

| ΔΕΙΓΜΑ | Ημερομηνία Παραλαβής | ΦΥΛΟ | ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ) | ΣΧΟΛΙΑ | Θολερότητα σε θρεπτικό ζωμό (nutrient broth) | ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ | | test οξειδάσης | Μικροβιολογικό εύρημα |
|--------|----------------------|---------|--------------|---|--|--|--|----------------|-----------------------|
| | | | | | | Τοιχώματα | Υγρό | | |
| 13 | 6/6/2019 | | | | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | (+) | Ps. aeruginosa |
| 21 | 14/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | | | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base | (-) | (+) | Ps.aeruginosa |
| 23 | 13/6/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 27 | Θήκη 3 μηνών | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | (+) | Ps. aeruginosa |
| 24 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 24 | Αριστερό μάτι θολή όραση, έντονη χρώση κερατοειδή/ κερατίτιδα | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | (+) | Ps. aeruginosa |
| 25 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 20 | Φοράει φακό μόνο στο δεξί μάτι/ θήκη 6 μηνών | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | (+) | Ps. aeruginosa |
| 75 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 18 | ΑΟ ένα σημείο στήξης κεντρικά(θήκη 6 μήνες) | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες P.agar base | Αναπτύχθηκαν αποικίες P.agar | (+) | Ps.auroginosa |
| 77 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 18 | Δεν εξετάστηκε | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες P.agar base | Αναπτύχθηκαν αποικίες P.agar base | (+) | Ps.auroginosa |

Πίνακας 3.3 Συνολικά αποτελέσματα

| ΔΕΙΓΜΑ | Ημερομηνία Παραλαβής | ΦΥΛΟ | ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ) | ΣΧΟΛΙΑ | Θολερότητα σε θρεπτικό ζωμό (nutrient broth) | ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ | | test οξειδάσης | Μικροβιολογικό εύρημα |
|--------|----------------------|---------|--------------|--|--|--|--|----------------|-----------------------------------|
| | | | | | | Τοιχώματα | Υγρό | | |
| 2 | 13/6/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 22 | Χωρίς ευρήματα | (-) | (-) | (-) | | |
| 5 | 30/5/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 22 | | (-) | (-) | (-) | | |
| 6 | 30/5/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 21 | | (-) | (-) | (-) | | |
| 7 | 30/5/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 21 | | (-) | (-) | (-) | | |
| 8 | 30/5/2019 | | | | (-) | (-) | (-) | | |
| 9 | 6/6/2019 | | | | (-) | (-) | (-) | | |
| 10 | 30/5/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 21 | | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε Mac Conkey | (-) | | άγνωστος Gram (-) μικροοργανισμός |
| 11 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 28 | Αριστερό μάτι θηλές άνω βλέφαρο/θήκη 2 μηνών | (-) | (-) | (-) | | |
| 12 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 25 | Χωρίς ευρήματα/θήκη 6 μηνών | (-) | (-) | (-) | | |
| 13 | 6/6/2019 | | | | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | (+) | Ps. aeruginosa |
| 14 | 6/6/2019 | | | | (-) | (-) | (-) | | |
| 15 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 23 | θήκη 2 μηνών | (-) | (-) | (-) | | |

| | | | | | | | | | |
|----|-----------|---------|----|---|-----|--|---|-----|----------------|
| 17 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 23 | Αριστερό μάτι χρώση κερατοειδή/ θήκη 2 μηνών | (-) | (-) | (-) | | |
| 18 | 6/6/2019 | | | | (-) | (-) | (-) | | |
| 19 | 13/6/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 37 | θήκη 2 εβδομάδων | (-) | (-) | (-) | | |
| 21 | 14/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | | | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base | (-) | (+) | Ps.aeruginosa |
| 23 | 13/6/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 27 | Θήκη 3 μηνών | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | (+) | Ps. aeruginosa |
| 24 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 24 | Αριστερό μάτι θολή όραση, έντονη χρώση κερατοειδή/ κερατίτιδα | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και Mac Conkey | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | (+) | Ps. aeruginosa |
| 25 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 20 | Φοράει φακό μόνο στο δεξί μάτι/ θήκη 6 μηνών | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base και MacConkey | (+) | Ps. aeruginosa |
| 26 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 23 | θήκη 1 μήνα | (-) | (-) | (-) | | |
| 27 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 22 | νεοαγγείωση/ θήκη 1 μήνα | (-) | (-) | (-) | | |
| 31 | 13/6/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 22 | επιπεφυκίτιδα δεξί και αριστερό μάτι | (-) | (-) | (-) | | |
| 32 | 4/7/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 27 | ερεθισμός ΔΟ, χρώση κερατοειδή | (+) | (-) | (-) | | |

| | | | | | | | | | |
|----|------------|---------|----|--|-----|---------------------------------------|----------------------------------|-----|--------------------------|
| | | | | ΔΟ + ΑΟ (θήκη 6μηνών) | | | | | |
| 33 | 4/7/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 23 | φυσιολογική εικόνα (θήκη 1μήνα) | (+) | (-) | (-) | | |
| 34 | 4/7/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 32 | ερεθισμός επιπεφυκότα και χρώση (θήκη 2 μηνών) | (+) | (-) | (-) | | |
| 35 | 4/7/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 23 | ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΕΞΕΤΑΣΤΕΙ (θήκη 7μηνών) | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base | Ανάπτυξη αποικιών σε P.agar base | (-) | άγνωστος μικροοργανισμός |
| 36 | 4/7/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 26 | θήκη ενός μήνα | (+) | (-) | (-) | | |
| 38 | 12/11/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 23 | θήκη 1 χρόνου | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες σε P. agar base | (-) | (-) | άγνωστος μικροοργανισμός |
| 39 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 26 | ΑΟ στίξη κερατοειδούς | (-) | (-) | (-) | | |
| 40 | 26/7/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 20 | θήκη 1χρόνου | (-) | (-) | (-) | | |
| 41 | 26/7/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 17 | θήκη 3 μηνών | (-) | (-) | (-) | | |
| 42 | 26/7/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 25 | επιπεφυκίτιδα (θήκη 2μηνών) | (-) | (-) | (-) | | |
| 43 | 26/7/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 29 | κερατίτιδα (θήκη 1 μήνα) | (+) | (-) | (-) | | |
| 44 | 26/7/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 16 | θήκη 2μηνών | (+) | (-) | (-) | | |
| 45 | 26/7/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 20 | θήκη 2 μηνών | (-) | (-) | (-) | | |
| 46 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 25 | θήκη 1 μήνα | (-) | (-) | (-) | | |

| | | | | | | | | | |
|----|------------|---------|----|---|-----|--|-----|-----|--|
| 47 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 25 | Θήκη 3 μηνών | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε Mac Conkey | (-) | (-) | άγνωστος Gram (-) μικροοργανισμός |
| 48 | 11/9/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 23 | Θήκη 3 μηνών (όχι υγρό) | (-) | | (-) | | |
| 50 | 11/9/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 30 | θήκη 15 ημερων(επιπεφυκίτιδα ΔΟ-ΑΟ) όχι υγρό | (+) | Ανάπτυξη αποικιών σε Mac Conkey | (-) | (-) | άγνωστος Gram (-) μικροοργανισμός |
| 51 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 20 | θήκη 1 χρόνου στίξη κερατοειδούς) | (-) | (-) | (-) | | |
| 52 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 28 | Θήκη 3 μηνών (ΑΟ επιπεφυκίτιδα) | (-) | (-) | (-) | | |
| 53 | 11/9/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 29 | όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 54 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 27 | θήκη 6 μήνες (έντονη επιπεφυκίτιδα ΔΟ) | (-) | (-) | (-) | | |
| 57 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 24 | όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 58 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 23 | θήκη 1 μήνα (όχι υγρό) | (-) | (-) | (-) | | |
| 59 | 11/9/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 20 | θήκη 1 εβδομάδα (κερατίτιδα ΔΟ - Δεξιός φακός μόνο) | (-) | (-) | (-) | | |
| 60 | 12/11/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 30 | Διήθηση κερατοειδή ΑΟ(θήκη 1 1/2 μήνα) | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες (άχρωμες) σε M agar και σε P. agar | (-) | (-) | άγνωστος μικροοργανισμός |

| | | | | | | | | | |
|--------|------------|---------|----|--|-----|--|-----|-----|--|
| 61 | 12/11/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 23 | Θήκη 1 μήνα | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες σε P. agar base | (-) | (-) | άγνωστος μικροοργανισμός |
| 62 (A) | 12/11/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 40 | Θήκη 1 μήνα | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες (άχρωμες) σε Mac agar και σε P. agar | (-) | (-) | άγνωστος Gram (-) μικροοργανισμός |
| 62 (B) | 12/11/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 40 | Θήκη 2 μήνες (όχι υγρό) | (-) | (-) | (-) | | |
| 63 | 12/11/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 20 | Χρώση κερατοειδή ΑΟ (όχι υγρό) | (-) | (-) | (-) | | |
| 64 | 12/11/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 21 | Επιπεφυκίτιδα (θήκη 1 χρόνου) | (-) | (-) | (-) | | |
| 65 | 12/11/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 18 | Θήκη 1 1/2 μήνα | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες μόνο σε P. agar base | (-) | (-) | άγνωστος μικροοργανισμός |
| 66 | 12/11/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 38 | Ξηροφθαλμία- Στήξη κερατοειδή ΔΟ(θήκη 2 μήνες, την έπλυσε πριν τον έλεγχο) | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες σε P. agar base | (-) | (-) | άγνωστος μικροοργανισμός |
| 67 | 12/11/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 27 | θήκη 1 μήνα | (-) | (-) | (-) | | |
| 68 | 10/12/2019 | | | δεν εχω στοιχεία* | (-) | (-) | (-) | | |
| 69 | 03/02/20 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 21 | Χωρίς ευρήματα (θήκη 1 1/2μήνες) όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 70 | 10/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 22 | Θήκη 1 μήνα | (-) | (-) | (-) | | |

| | | | | | | | | | |
|--------|------------|---------|----|---|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----|---------------|
| 71 (A) | 16/12/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 21 | Παλαιά θήκη (μηνιαία χρήση Αύγουστος έως Σεπτέμβριος) | (-) | (-) | (-) | | |
| 71 (B) | 16/12/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 21 | ΔΟ +ΑΟ Επιπεφυκίτιδα και στήξη ΔΟ | | (-) | (-) | | |
| 73 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 30 | Στήξη ΔΟ (όχι υγρό) | (+) | (-) | (-) | | |
| 74 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 35 | Χωρίς ευρήματα (θήκη 6 μήνες) όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 75 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 18 | ΑΟ ένα σημείο στήξης κεντρικά(θήκη 6 μήνες) | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες P.agar base | Αναπτύχθηκαν αποικίες P.agar base | (+) | Ps.auroginosa |
| 76 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | | Δεν εξετάστηκε | (-) | | | | |
| 77 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 18 | Δεν εξετάστηκε | (+) | Αναπτύχθηκαν αποικίες P.agar base | Αναπτύχθηκαν αποικίες P.agar base | (+) | Ps.auroginosa |
| 78 | 16/12/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 18 | Χωρίς ευρήματα (θήκη 2 χρόνια) όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 79 | 16/12/2019 | ΑΝΔΡΑΣ | 19 | Θήκη 2 μήνες (όχι υγρό) | (-) | (-) | (-) | | |
| 80 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 19 | Βλεφαρίτιδα ΑΟ (θήκη 1 μήνα) όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |

| | | | | | | | | | |
|----|------------|---------|----|--|-----|-----|-----|--|--|
| 81 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 18 | Θήκη 3 μήνες | (+) | (-) | (-) | | |
| 82 | 16/12/2019 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 25 | ΑΟ λίγη βλέννη (θήκη 3 μήνες) | (+) | (-) | (-) | | |
| 83 | 03/02/20 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 27 | Βλεφαρίτιδα ΑΟ (θήκη 1 μήνα) | (-) | (-) | (-) | | |
| 84 | 03/02/20 | ΑΝΔΡΑΣ | 27 | ερεθισμός επιπεφυκότα (θήκη 1 μηνά) | (-) | (-) | (-) | | |
| 85 | 03/02/20 | ΑΝΔΡΑΣ | 40 | Δεν εξετάστηκε (θήκη 1 χρόνο) μόνο swab | (-) | (-) | (-) | | |
| 86 | 03/02/20 | ΑΝΔΡΑΣ | 27 | Θήκη 3 μήνες , όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 87 | 03/02/20 | ΑΝΔΡΑΣ | 31 | Χωρίς ευρήματα (θήκη 2μήνες) | (-) | (-) | (-) | | |
| 88 | 03/02/20 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 25 | Επιφανειακή στίξη ΔΟ-ΑΟ (θήκη 1 χρόνος) όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 89 | 03/02/20 | ΑΝΔΡΑΣ | 28 | θήκη 6 μήνες, όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 90 | 03/02/20 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 28 | Ερεθισμός επιπεφυκότα, θήκη 1 μήνα | (-) | (-) | (-) | | |
| 91 | 03/02/20 | ΑΝΔΡΑΣ | 18 | Επιπεφυκίτιδα- Βλέννη ΔΟ-ΑΟ (θήκη 1 μήνα), όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |

| | | | | | | | | | |
|----|----------|---------|----|--------------------------------------|-----|-----|-----|--|--|
| 92 | 03/02/20 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 20 | Δεν εξετάστηκε, όχι υγρό | (-) | (-) | (-) | | |
| 93 | 03/02/20 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 33 | ΑΟ Στίξη κερατοειδούς - θήκη 3 μήνες | (-) | (-) | (-) | | |
| 94 | 03/02/20 | ΓΥΝΑΙΚΑ | 38 | Χωρίς ευρήματα- θήκη 2 μήνες | (-) | (-) | (-) | | |

Κεφάλαιο 4. Συζήτηση

Οι λοιμώξεις του οφθαλμού αποτελούν ένα ιδιαίτερα σοβαρό ζήτημα τόσο για τους ίδιους τους ασθενείς όσο και για τους κλινικούς ιατρούς. Ο οφθαλμός διαθέτει ένα σύνολο φυσικών αμυντικών μηχανισμών που παρέχουν προστασία έναντι των λοιμώξεων από μικροοργανισμούς αλλά και κακώσεων από εξωγενείς παράγοντες. Ωστόσο, οι λοιμώξεις του οφθαλμού, όπως η κερατίτιδα, παρατηρούνται συχνά και οφείλονται σε λοιμογόνους και μη παράγοντες [1, 2].

Η συστηματική χρήση φακών επαφής, συγκαταλέγεται στους πιο κοινούς παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης βακτηριακής κερατίτιδας, μια λοίμωξη ιδιαίτερα απειλητική για την όραση, η οποία χωρίς τη λήψη έγκαιρης και κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, μπορεί να οδηγήσει σε ολική τύφλωση. Μεταξύ των πιο συχνών παθογόνων που ενοχοποιούνται για την πρόκληση κερατίτιδας που σχετίζεται με την χρήση φακών επαφής είναι το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* [1-9].

Για το λόγο αυτό, στη παρούσα διπλωματική εργασία θήκες φακών επαφής υγιών εθελοντών ελέγχθηκαν για την παρουσία της *Pseudomonas aeruginosa*, εφαρμόζοντας βιοχημικές μεθόδους. Συνολικά, οι επιμολυσμένες θήκες ήταν 17 (17/82 ή 20,7%), εκ των οποίων οι 7 βρέθηκαν θετικές για *Pseudomonas aeruginosa*. Βάσει των στοιχείων που αναγράφονταν στα παραπεμπτικά που συνόδευαν τα δείγματα, ο παρατεταμένος χρόνος χρήσης των θηκών φύλαξης σχετίζεται άμεσα με την επιμόλυνση τους. Δυστυχώς, η έλλειψη στοιχείων από αρκετά δείγματα, δεν επέτρεψε την ακριβή διερεύνηση και αξιολόγηση. Σύμφωνα, με παρόμοιες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, εκτός από την διάρκεια χρήσης, άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την επιμόλυνση των θηκών, είναι η συχνότητα και ο τρόπος καθαρισμού. Επίσης, σε κάποιες μελέτες λαμβάνεται υπόψη και η κατασκευαστική εταιρία τόσο της θήκης, όσο και των φακών και του υγρού καθαρισμού.

Η μελέτη των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, με την μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ, φανέρωσε την παρουσία ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών στελεχών *Ps. aeruginosa* στα δείγματα θηκών φύλαξης. Το γεγονός αυτό εκθέτει τους χρήστες-κατόχους των συγκεκριμένων θηκών σε επιπλέον κίνδυνο λοίμωξης με περιορισμένες επιλογές κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Βέβαια, για μια πιο ολοκληρωμένη διερεύνηση των παραπάνω ευρημάτων, απαιτούνται επιπλέον στοιχεία σχετικά με τη κλινική κατάσταση των υγιών εθελοντών που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη.

Αναφορές

1. Mannis M, Smolin G. Natural defense mechanisms, of the ocular surface. In: Pepose J, Holland G, Wilhebmus K (eds). *Ocular infection and immunity*. London, Mosby, 1996:185-190
2. Brad J. Hall, Lyndon Jones, Contact Lens Cases: The Missing Link in Contact Lens Safety? *Eye & Contact Lens* 2010;2: 101-105
3. Dart J. The inside story: Why contact lens cases become contaminated. *Cont Lens Anterior Eye* 1997; 20:113–118.
4. McLaughlin-Borlace L, Stapleton F, Matheson M, et al. Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *J Appl Microbiol* 1998;84:827–838.
5. Willcox MD, Power KN, Stapleton F, et al. Potential sources of bacteria that are isolated from contact lenses during wear. *Optom Vis Sci* 1997;74: 1030–1038.
6. Gray TB, Cursons RT, Sherwan JF, et al. Acanthamoeba, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br J Ophthalmol* 1995;79:601– 605.
7. Pens CJ, da Costa M, Fadanelli C, et al. Acanthamoeba spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. *Parasitol Res* 2008;103:1241–1245
8. Devonshire P, Munro FA, Abernethy C, et al. Microbial contamination of contact lens cases in the west of Scotland. *Br J Ophthalmol* 1993;77:41–45.
9. Larkin DF, Kilvington S, Easty DL. Contamination of contact lens storage cases by Acanthamoeba and bacteria. *Br J Ophthalmol* 1990;74:133–135.
10. Fleiszig SM, Efron N. Microbial flora in eyes of current and former contact lens wearers. *J Clin Microbiol* 1992;30:1156 –1161.
11. Illingworth CD, Cook SD. Acanthamoeba keratitis. *Surv Ophthalmol* 1998; 42:493–508.
12. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435– 464.
13. Richard V. Goering, Hazel M. Dockrell, Mark Zuckerman, Peter L. Chiodini, Medical Microbiology and Immunology, 6^η Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις ELSEVIER, σελ.14, 152-154, 331-335.

14. Patrick R. Murray, Kens S. Rosenthal, Michael A. Pfaller, Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Νίκος Α. Μαλισιόβας, Ιατρική Μικροβιολογία, 6^η Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε, σελ. 359-362
15. Γεώργιος Γκαντέρης, Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική, Τόμος 16, Τεύχος 2, σελ. 64-74
16. Keay L, Edwards K, Naduvilath T, et al. Microbial keratitis: predisposing factors and morbidity. *Ophthalmology* 2006;113:109-16
17. Schein OD, Glynn RJ, Poggio EC, Seddon JM, Kenyon KR. The relative risk of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. A case-control study. Microbial Keratitis Study Group. *N Engl J Med* 1989, **321**: 773-778.
18. Poggio EC, Glynn RJ, Schein OD, Seddon JM, Shannon MJ, Scardino VA, Kenyon KR. The incidence of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. *N Engl J Med* 1989, **321**: 779-783.
19. David J. Evans, Nancy A. Mcnamara, Suzanne M. J. Fleiszig, Life at the Front: Dissecting Bacterial-Host Interactions at the Ocular Surface, *The Ocular Surface* ISSN: 1542-0124. 2007; 5(3):213-227.
20. Morgan PB, Efron N, Hill EA, et al. Incidence of keratitis of varying severity among contact lens wearers. *Br J Ophthalmol* 2005;89:430-6
21. Amy Lagina, OD. Review of Contact Lenses: Beware the Biofilm, What are practitioners doing to prevent this common formation and the risk it poses to contact lens wearers? <https://www.reviewofcontactlenses.com/article/beware-the-biofilm>
22. Todar K. (2014) Online Textbook of Bacteriology: www.textbookofbacteriology.net
23. Arora S.K., Wolfgang M.C., Lory S., Ramphal R. (2004), Sequence Polymorphism in the Glycosylation Island and Flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Clinical Microbiology*, 186 (7):2115–2122
24. Μενεγάτου Δ., Νικολοπούλου- Ντέρου Ε., Παυλινέρη Π. (2001), Μικροβιολογία ΙΙ, Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, Αθήνα, σελ. 73-76
25. Croft L., Beatson S.A., Whitchurch C.B., Huang B., Blakeley R.L., Mattick J.S. (2000), An interactive web-based *Pseudomonas aeruginosa* genome database : discovery of new genes, pathways and structures, *Microbiology*, 146:2351–2364
26. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. (2009), Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4):582–610

27. Kerr K.G. & Snelling A.M. (2009), *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary, *Journal of Hospital Infection*, 73:338-344
28. Igbinsola E.O., Odjadjare E.E., Igbinsola I.H., Orhue O.P., Omoigberale M.N. & Amhanre N.I. (2012), Antibiotic synergy interaction against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an abattoir effluent environment, *The Scientific World Journal*, a:308034 (doi: 10.1100/2012/308034)
29. Horianopoulou M., Legakis N.J., Kanellopoulou M., Lambropoulos S., Tsakris A., Falagas M.E. (2006), Frequency and predictors of colonization of the respiratory tract by VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* in patients of a newly established intensive care unit, *J Med Microbiol.*, 10:1435-9
30. Bonomo R.A. & Szabo D. (2006), Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin Infect Dis*, 43(2):49–56
31. Strateva T. & Yordanov D. (2009), *Pseudomonas aeruginosa*- a phenomenon of bacterial resistance, *J Med Microbiol*, 58(9):1133-1148 (doi: 10.1099/jmm.0.009142-0)
32. Driscoll J.A., Brody S.L., Kollef M.H. (2007), The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections, *Drugs*, 67 (3):351-368
33. Balasoiu M., Balasoiu A.T., Manescu R., Avramescu C., Ionete O. (2014), *Pseudomonas aeruginosa* Resistance Phenotypes and Phenotypic Highlighting Methods, *Current Health Sciences Journal*, 40(2):85-92

Πηγές Εικόνων

<https://www.unilens.gr/el/matia-orasi/2016-05-08-13-44-44.html> Εικόνα 1.1: Ανατομία οφθαλμού.

<https://ophthalmiatros-pavlopoulos.gr/> Εικόνα 1.2: Κλινική εικόνα του έλκους του κερατοειδούς λοιμώδους αιτιολογίας.

<https://www.cmaj.ca/content/190/2/E54> Εικόνα 1.3: Έλκος κερατοειδούς από *Pseudomonas aeruginosa*,

<https://ophthalmiatros-pavlopoulos.gr/> Εικόνα 1.4: Κλινική εικόνα άσηπτης κερατίτιδας

[https://hms.org.gr/wp-content/uploads/2016/10/Acta-](https://hms.org.gr/wp-content/uploads/2016/10/Acta-Microbiologica_Volume59_Issue3_2014.pdf)

[Microbiologica Volume59 Issue3 2014.pdf](https://hms.org.gr/wp-content/uploads/2016/10/Acta-Microbiologica_Volume59_Issue3_2014.pdf), Εικόνα 1.5: Στάδια σχηματισμού των βιομεμβρανών

<http://www.labm.com/organisms/pseudomonas/?pi=24> Εικόνα 3.2: Φθορίζουσες αποικίες *Ps. aeruginosa* σε *Pseudomonas* agar base