CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

Traduzione da "Infections and drug resistance" 2019:12 501-510
(versione originale scaricabile da https://www.dovepress.com/impact-of-a-probiotic-based-hospital-sanitation-on-antimicrobial-resis-peer-reviewed-article-IDR)

IMPATTO DI UN METODO DI SANIFICAZIONE OSPEDALIERA A BASE DI PROBIOTICI SULLA RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI, SUL LORO CONSUMO E SUI COSTI ASSOCIATI ALL'INSORGENZA DI ICA: UNO STUDIO MULTICENTRICO

Elisabetta Caselli[1,2], Luca Arnoldo[3], Carla Rognoni[4], Maria D'Accolti[1,2], Irene Soffritti[1,2], Luca Lanzoni[2], Matteo Bisi[2], Antonella Volta[2], Rosanna Tarricone[4], Silvio Brusaferro[3], Sante Mazzacane[2]

[1]Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara, Ferrara, Italia; [2]CIAS Centro di Ricerche Interdipartimentale, Dipartimento di Architettura e Scienze Mediche, Università di Ferrara, Ferrara, Italia; [3]Dipartimento di Medicina, Università di Udine, Udine, Italia; [4] Centro di Ricerche sulla Gestione dell'Assistenza Sanitaria e Sociale (CERGAS), Dipartimento di Analisi delle Politiche e Management Pubblico, Università Bocconi, Milano, Italia.

Scopo: una fra le maggiori minacce per la salute umana è la resistenza agli antimicrobici (AMR). La frequente presenza di microrganismi patogeni resistenti presenti negli ambienti ospedalieri può contribuire ad aumentare la trasmissione di Infezioni Correlate all'Assistenza sanitaria (ICA) di difficile trattamento terapeutico. Di recente abbiamo rilevato che, a confronto con metodi di pulizia convenzionali, l'impiego di un metodo di sanificazione basato sull'utilizzo di microrganismi (*Probiotic Cleaning Hygiene System* [PCHS]), è associabile alla rimodulazione del microbiota ospedaliero ed alla riduzione di incidenza di ICA. A tal proposito, ci siamo dati come scopo il valutare l'impatto del PCHS sulle AMR e gli effetti ad esso correlati, come ad esempio il consumo ed i costi dei farmaci antimicrobici associati ad ICA.

Pazienti e metodi: 5 ospedali Italiani, coinvolti in uno studio multicentrico in cui metodi di sanificazione convenzionali sono stati sostituiti con il PCHS, sono stati inclusi in questa analisi. Il periodo di studio ha avuto una durata di osservazione di 6 mesi per entrambi i metodi di sanificazione. L'AMR del microbiota presente sulle superfici, è stato valutato attraverso l'utilizzo di *microarray*, *nested PCR,* antibiogrammi e test di microdiluizione. I dati sul consumo dei farmaci e sui costi associati sono stati ottenuti tramite le cartelle cliniche di tutti i pazienti ospedalizzati affetti da ICA.

Risultati: l'utilizzo di PCHS è stato associato ad una diminuzione fino al 99% dei geni codificanti AMR nel microbiota delle superfici ospedaliere, indipendentemente dai tipi di resistenza originariamente presenti in ogni ospedale (P_c <0.01). Test funzionali hanno confermato il dato molecolare, dimostrando una diminuzione del 33%-100% dei ceppi resistenti a seconda del tipo di antibiotico. Il consumo di farmaci antimicrobici associati alla comparsa di ICA ha mostrato un calo globale del 60.3%, con una diminuzione del 75.4% dei costi associati.

[1] Traduzione dell'articolo: Elisabetta Caselli, Luca Arnoldo, Carla Rognoni, Maria D'accolti, Irene Soffritti, Luca Lanzoni, Matteo Bisi, Antonella Volta, Rosanna Tarricone, Silvio Brusaferro, Sante Mazzacane (2019) Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: a multicenter study
Infection and Drug Resistance 2019:12 501–510. http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S194670

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

Conclusione: la diffusione di AMR nell'ambiente ospedaliero può essere limitata attraverso l'impiego di metodi di sanificazione capaci di rimodulare il microbiota ospedaliero e di ridurre il consumo ed i costi di antimicrobici. Questo metodo potrebbe essere valutato come parte di più ampie strategie di prevenzione e di controllo delle infezioni.

SINTESI DEL PROGETTO

La resistenza agli antimicrobici (AMR) è una delle minacce maggiori per la salute umana e si riscontra frequentemente in infezioni acquisite durante il periodo di ricovero in ospedale (infezioni Correlate all'Assistenza sanitaria, ICA). La AMR può rendere difficile o impossibile il trattamento farmacologico dei pazienti infetti. I microbi resistenti contaminano l'ambiente ospedaliero, contribuendo all'insorgenza di ICA, ed i metodi di sanificazione a base chimica non sono in grado di tenere sotto controllo lo sviluppo di AMR e possono addirittura contribuire alla selezione di ceppi resistenti. In uno studo precedente svolto in 5 ospedali Italiani abbiamo osservato che il metodo di sanificazione basato sull'utilizzo di probiotici (*Probiotic Cleaning Hygiene System,* PCHS), ha mostrato di ridurre stabilmente la contaminazione microbica, con conseguente diminuzione di insorgenza di ICA.

In questo studio ci siamo focalizzati sull'analisi dell'impatto del PCHS sull'AMR, e sul consumo e i costi delle terapie antimicrobiche associate alle ICA. Dai risultati ottenuti è stato osservato che l'uso di PCHS è associato ad una diminuzione fino al 99% dell'AMR del microbiota residente sulle superfici, rispetto all'impiego di metodi di sanificazione convenzionali con utilizzo di prodotti chimici. Oltre a questo, è stata verificata una diminuzione del 60.3% sul consumo di antibiotici relativi ad ICA, con conseguente calo del 75.4% sui costi associati.

In conclusione, questi risultati suggeriscono che un adeguato intervento ambientale, capace di modulare il microbiota ospedaliero, può contestualmente ostacolare la diffusione di AMR nell'ambiente ospedaliero, contribuendo a limitare l'incidenza di ICA e riducendo il consumo ed i costi di farmaci antimicrobici associati ad ICA, e potrebbe dunque essere considerato come un elemento vantaggioso nelle strategie volte a prevenire le infezioni.

INTRODUZIONE

La prevenzione ed il controllo delle Infezioni Correlate all'Assistenza sanitaria (ICA) dipendono da molteplici fattori, fra cui l'adozione di basilari precauzioni per prevenire la trasmissione di patogeni, una corretta igienizzazione ambientale, diagnosi appropriate e l'impiego oculato degli antibiotici. Le ICA sono diventate un problema globale e incidono negativamente sia sugli esiti terapeutici, provocando l'allungamento del periodo di degenza, sia sui costi da sostenere per l'assistenza sanitaria. In Europa, oltre 3 milioni di pazienti ogni anno contraggono ICA, con 37.000 decessi come diretta conseguenza[1]. La causa viene anche collegata all'aumento di resistenze agli antimicrobici (AMR) sviluppate dai patogeni associati ad ICA[2,3], come ad esempio enterococchi resistenti alla vancomicina, stafilococchi resistenti alla meticillina ed Enterobatteriaceae resistenti ai carbapenemi. Le ICA sono sostenute da microbi resistenti molto più frequentemente rispetto alle infezioni nella popolazione generale[4], rappresentando una ulteriore minaccia per i pazienti ospedalizzati[5].

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

La costante contaminazione delle superfici ospedaliere contribuisce in modo importante alla trasmissione di ICA[6-10], poiché tali superfici fungono da serbatoio per i patogeni, inclusi quelli farmaco-resistenti[6,7,9-13]. In particolare, quelli più frequentemente riscontrati risultano essere: *Staphylococcus aureus* resistenti alla meticillina, Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi o multiresistenti (Multi Drug Resistant, MDR) e *Pseudomonas* spp[6,12,13].
Inoltre, di recente abbiamo osservato che si possono riscontrare frequentemente anche categorie meno comuni di AMR nell'ambiente ospedaliero, come ad esempio la resistenza plasmidica, indotta dal plasmide *mcr-1*, alla colistina (colR), che rappresenta l'ultima risorsa in caso di infezioni indotte da batteri gram-negativi MDR. Infatti, è stato scoperto che fino all'8% dei batteri gram-negativi isolati dalle superfici di ospedali italiani presenta il plasmide *mcr-1* codificante per colR[14]. Il valore osservato è risultato superiore rispetto al dato ottenuto da isolati provenienti da pazienti, dove tale resistenza è stata identificata solamente nell' 1-2% dei campioni, suggerendo l'ipotesi che l'ambiente ospedaliero possa fungere da serbatoio che promuove la trasmissione di colR[14].
Tecniche convenzionali di sanificazione basate sull'utilizzo di detergenti/disinfettanti chimici non prevengono la ricontaminazione [15,16] e possono inoltre contribuire alla selezione di patogeni MDR associati ad ICA[17,18], peggiorando ulteriormente il problema dell'AMR. D'altro canto, abbiamo recentemente dimostrato che l'approccio alla sanificazione basato sull'utilizzo di detergenti ecologicamente sostenibili contenenti spore di *Bacillus* probiotici (PCHS), può indurre fino al il 90% di riduzione dei livelli di patogeni presenti sulle superfici rispetto all'utilizzo di detergenti convenzionali[19,20] senza indurre la selezione di ceppi farmaco-resistenti, come dimostrato dalle analisi molecolari dell'intero resistoma del microbiota[19,21,22]. Per di più, un recente studio multicentrico eseguito in 5 ospedali Italiani, dove il PCHS è stato comparato ad una sanificazione con prodotti chimici, ci ha permesso di confermare che l'impiego del PCHS induce una diminuzione stabile e consistente dei livelli di patogeni sulle superfici, inclusi quelli resistenti, con conseguente calo del 52% dell'incidenza delle ICA nei pazienti ospedalizzati[23]. Il presente studio si è prefissato l'obiettivo di analizzare le caratteristiche di AMR del microbiota ospedaliero prima e dopo l'introduzione del PCHS e di valutare il potenziale impatto nell'utilizzo del PCHS sul consumo e sui costi associati dei farmaci antimicrobici relativi alle ICA.

PAZIENTI E METODI

PROGETTO DI STUDIO:
Il progetto ed il tipo di studio multicentrico, durato più di 18 mesi in 5 ospedali Italiani (ISRCTN Registro: ISRCTN58986947), è stato già descritto in precedenza[23].
Brevemente, i reparti di Medicina Interna degli ospedali oggetto di studio sono stati monitorati per 6 mesi d'impiego del metodo di sanificazione convenzionale, basato sull'utilizzo di disinfettanti chimici, e per altri 6 mesi d'impiego del sistema PCHS, basato sull'utilizzo di prodotti arricchiti con microorganismi probiotici. La sanificazione basata sul metodo PCHS è stata applicata quotidianamente, utilizzando detergenti ecologicamente sostenibili contenenti spore di 3 specie di *Bacillus* (*Bacillus subtilis, Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*). Il personale delle pulizie è rimasto invariato durante il periodo di studio ed è stato adeguatamente formato sulle procedure di applicazione del metodo PCHS. La formazione è stata limitata all'insegnamento di metodi corretti per l'utilizzo e la

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

preparazione dei detergenti PCHS, e non sono state introdotte altre variabili. Il personale ospedaliero e i pazienti ricoverati non sono stati avvisati al momento della sostituzione del metodo di sanificazione.
Tutti gli ospedali coinvolti hanno ottenuto l'approvazione dal Comitato Etico ed il consenso a non introdurre altri metodi che potenzialmente potessero influenzare l'incidenza di ICA durante il periodo di studio.
Il monitoraggio è durato dal 01 Gennaio 2016 al 30 Giugno 2017; il periodo è stato suddiviso in una fase di osservazione di pre-intervento della durata di 6 mesi (pre-PCHS), in cui gli ospedali hanno mantenuto le procedure di sanificazione convenzionali, basate sull'utilizzo di prodotti a chimici, ed in una successiva fase di osservazione di post-intervento di 6 mesi (PCHS), in cui il PCHS è stato impiegato quotidianamente. La carica microbica ambientale e le ICA sono state monitorate durante tutto il periodo di studio.

ANALISI DELL'AMR AMBIENTALE:
Ogni mese, sono stati prelevati in doppio campioni del microbiota delle superfici ospedaliere, in 3 punti rappresentativi della stanza (pavimento, pediera del letto, lavabo) in 3-6 stanze per ospedale scelte casualmente, come già descritto in precedenza[19,21,23]. Per la raccolta della popolazione microbica totale, sono stati strofinati tamponi sterili di rayon su un'area di 10x10 cm^2, come già descritto in precedenza[21]. Dai campioni di microbiota raccolti, è stato estratto il DNA totale utilizzando QIAmp UCP Pathogen Mini Kit (n. di catalogo: 50214; Qiagen, Hilden; Germany); il DNA è stato poi analizzato utilizzando un microarray in PCR real time quantitativa, in grado di valutare 84 geni di resistenza (Antibiotic Resistence Genes, numero di catologo: BAID-1901ZRA; Qiagen)[21]. In totale per l'analisi sono stati selezionati 756 campioni (378 nella fase di pre-intervento e 378 nella fase di intervento). Tutti i campioni, provenienti dalla fase pre-PCHS e PCHS, sono stati anche lasciati crescere in brodo MacConkey (n. catologo 402490; Liofilchem, Teramo- Italia) selettivo per le Enterobatteriacee, al fine di amplificare la loro popolazione e valutare la prevalenza del gene plasmidico *mcr-1* codificante per colR. La presenza di questo gene è stata verificata attraverso l'impiego di tecniche di PCR nested, come precedentemente descritto[14]. I risultati molecolari ottenuti sono stati confermati anche a livello funzionale su colonie singole attraverso l'isolamento in coltura, utilizzando un saggio di microdiluizione in brodo (Sensi Test Colistin, n. catalogo 75001; Liofilchem) come precedentemente descritto[14]. In totale sono stati analizzati 452 isolati di Enterobacteriaceae (223 nella fase di pre-intervento e 229 nella fase di intervento).
Inoltre, su tutte le colonie di *S. aureus* isolate da superfici campionate è stato valutato il livello di sensibilità ad antibiotico. In specifico, sono stati campionati gli stessi punti delle superfici utilizzando piastre a contatto (*replicate organism direct agar contact*) contenenti terreno Baird Parker (n. catalogo 163512; Liofilchem), selettivo per *Staphylococcus* spp. A seguito di 48 ore di incubazione a 37 °C, le colonie presunte di *S. aureus* sono state identificate mediante tipizzazione biochimica (Staph System 18R, n. catalogo 71630; Liofilchem), isolate, e infine caratterizzate per valutarne la sensibilità agli antibiotici attraverso l'analisi di antibiogrammi in piastre agar di Mueller Hinton (n. catalogo 105437; EMP Millipore, Billerica, MA, USA) con tecnica convenzionale di Kirby-Bauer per diffusione da dischi. Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: ampicillina (n.catalogo CT0003B Oxoid); vancomicina (n.catalogo CT0058B Oxoid), oxacillina (n.catalogo CT0040B Oxoid), cefotaxime (n.catalogo CT066B Oxoid), imipenem (n.catalogo CT0455B Oxoid), penicillina G (n.catalogo CT0043B Oxoid). Il diametro delle zone di inibizione[24] è

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

stato valutato in accordo con la Commissione Europea sui valori limite tabulati che testano la sensibilità antimicrobica, per l'interpretazione della concentrazione minima inibente (MIC) e i diametri di inibizione e il manuale d'Istituto Standards Clinico e di Laboratorio (26esima edizione)[25]. In totale sono stati analizzati 112 *S. aureus* isolati (80 nella fase di pre-intervento e 32 nella fase di intervento). Per isolati di *S. aureus* e di Enterobactericeae, la resistenza dei ceppi MDR è stata analizzata per 3 o più antibiotici, e la loro incidenza è stata confrontata fra le fasi di pre-PCHS e PCHS.

ANALISI DI DEL CONSUMO DI FARMACI ANTIMICROBICI ASSOCIATI AD ICA:
Come precedentemente descritto[23], tutti i nuovi pazienti ricoverati nei reparti coinvolti sono stati valutati per lo sviluppo di ICA nelle fasi pre-PCHS ed PCHS. In totale sono stati monitorati 11.461 pazienti, includendo nell'analisi tutti i tipi di ICA, in accordo con i criteri definiti dal Centro Europeo per la Prevenzione ed il Controllo di Malattie (ECDC)[26]. I dati di consumo antimicrobico sono stati ottenuti dalle cartelle cliniche dei pazienti. Per ogni paziente, sono stati raccolti elettronicamente 2 categorie di registrazioni cliniche riguardo dati generali e dati concernenti ogni eventuale ICA, localizzazione, agente eziologico, terapia farmacologica e risoluzione/esito dell'infezione. Tutti i dati sono stati mantenuti anonimi mediante raccolta su un sito web protetto da password.

ANALISI DEI COSTI DEI FARMACI ANTIMICROBICI ASSOCIATI AD ICA:
I costi diretti relativi ai trattamenti farmacologici delle ICA sono stati valutati mediante analisi quotidiana dei costi per paziente, includendo nell'analisi solo i costi di farmaci antimicrobici consumati (quindi escludendo i costi sui tempi di assistenza sanitaria per la somministrazione dei farmaci, l'utilizzo di apparecchiature e costi generici di degenza). Ad ogni ospedale è stato chiesto di fornire, per differenti tipologie di uso di antimicrobici, il costo giornaliero per paziente sulla terapia a dosi standard, distinguendo anche i costi per differenti vie di somministrazione. In casi di mancanza dei dati di un ospedale per un farmaco particolare, è stato considerato un prezzo "medio" basato sui valori forniti dagli altri ospedali. Il costo di ogni singola terapia farmacologica per paziente è stato calcolato moltiplicando il costo giornaliero per la durata della terapia. Il costo totale per paziente è stato calcolato sommando i costi delle differenti terapie somministrate. I costi totali di utilizzo di antimicrobici nella fase pre-PCHS e PCHS sono stati calcolati sommando il costo dei farmaci di pazienti con ICA distinti nei due periodi.

METODI STATISTICI:
Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test del Chi-quadrato e il test di Mann-Whitney per valutare la significatività di AMR negli isolati batterici e le differenze di genere (maschio/femmina) fra i gruppi di pazienti in fase pre-PCHS e in fase PCHS, il test Kolmogorov-Smirnov per valutare la normalità, e il test parametrico t-Student per valutare le differenze fra i dati ottenuti mediante microarray. E' stato considerato un valore di $P<0.05$ per valutare la significatività statistica dei dati. Per confronti multipli è stata applicata la correzione di Bonferroni per l'analisi dei dati microarray (è stato considerato significativo un valore di $P_c<0.05$). Le analisi sono state elaborate utilizzando il software IBM SPSS 23.

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

RISULTATI

IMPATTO DELLA SANIFICAZIONE SULLE AMR DEL MICROBIOTA OSPEDALIERO SUPERFICIALE:

Le analisi effettuate sulla carica microbica superficiale hanno indicato che la contaminazione era per lo più attribuibile alla presenza di *Staphylococcus* spp., genere che rappresenta più del 90% del microbiota superficiale totale, anche se altri generi erano presenti (inclusi Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Clostridium difficile* e *Candida* spp.). Come precedentemente riportato, l'impiego del PCHS si è associato ad un decremento medio dell'83% di tutti i patogeni rilevati, a confronto delle quantità riscontrate durante la fase di pre-intervento[23]. Analisi dettagliate dei tipi di patogeni monitorati, hanno rivelato che l'uso del PCHS porta ad un calo della carica superficiale del 57.2%–93.3% in confronto a quella rilevata durante la fase pre-PCHS, come riportato nella *Tabella 1*.

Tabella 1. *Variazioni della carica microbica individuale per ciascun patogeno durante la fase pre-PCHS e PCHS*

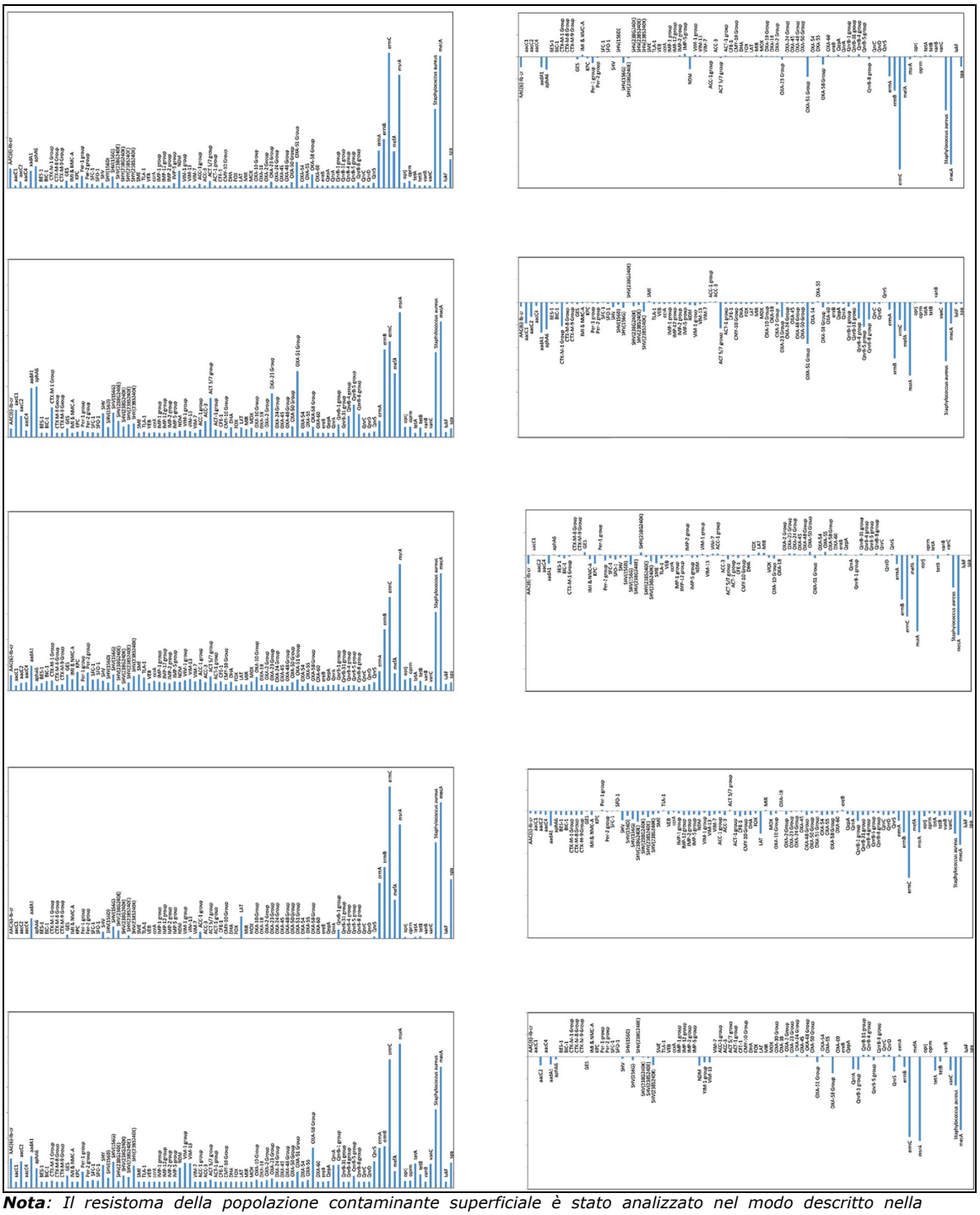
Pathogen type	Pre-PCHS[a]	PCHS[a]	Decrease (%)
Aspergillus spp.	181±307	12±6	93.3
Candida spp.	2,597±1,798	1,108±559	57.3
Clostridium difficile	334±290	132±219	60.5
Pseudomonas aeruginosa	970±982	415±350	57.2
Acinetobacter baumannii	2,844±841	520±726	81.7
Enterobacteriaceae spp.	1,774±901	189±135	89.3
Staphylococcus spp.	26,947±17,293	4,674±3,799	82.7

Nota [a]: i risultati sono espressi come valore medio di CFU/m^2 ± SD dei 5 ospedali coinvolti

Tutte le differenze si sono rivelate statisticamente significative ($P<0.05$). Sulla base di questi dati, ci siamo proposti di esaminare in dettaglio le caratteristiche dell'AMR della popolazione contaminante in ciascuna struttura ospedaliera, prima e dopo l'introduzione del PCHS. Come atteso, le analisi hanno rivelato che i geni di resistenza (R) presenti nel microbiota superficiale nel periodo pre-PCHS esibivano un diverso grado di prevalenza in ciascuno dei cinque ospedali monitorati, riflettendo potenzialmente la pressione selettiva esercitata, in ogni ambiente, dall'impiego preferenziale di certi antibiotici (*Figura 1*-sinistra). In generale, sono stati rilevati geni R codificanti per resistenze ad amminoglicosidi, fluorochinoloni, macrolidi, meticillina e vancomicina ed anche per le β-lattamasi di classe A, C e D. Comunque, in accordo con i livelli generalmente alti di contaminazione da *Staphylococcus* spp., il gene R maggiormente prevalente è stato *mecA*, il quale codifica per la resistenza alla meticillina, rappresentando da solo il 42.7% di tutti i geni R rilevati nel microbiota superficiale. I geni *ermC* (26.9%) e *msrA* (26.6%) si sono dimostrati anch'essi piuttosto abbondanti, mentre tutti gli altri geni identificati hanno rappresentato solo il 3.8% del resistoma. Con l'introduzione del PCHS sono state osservate diminuzioni significative dei geni R presenti nel microbiota osservato in ciascun ospedale, in confronto con quelli rilevati in corrispondenza del periodo di pre-intervento ($P_c<0.01$), indipendentemente dalla relativa abbondanza di geni R specifici presenti in tale fase della sperimentazione (*Figura 1*, destra).

Figura 1*: Analisi del resistoma del microbiota superficiale ospedaliero.*

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms



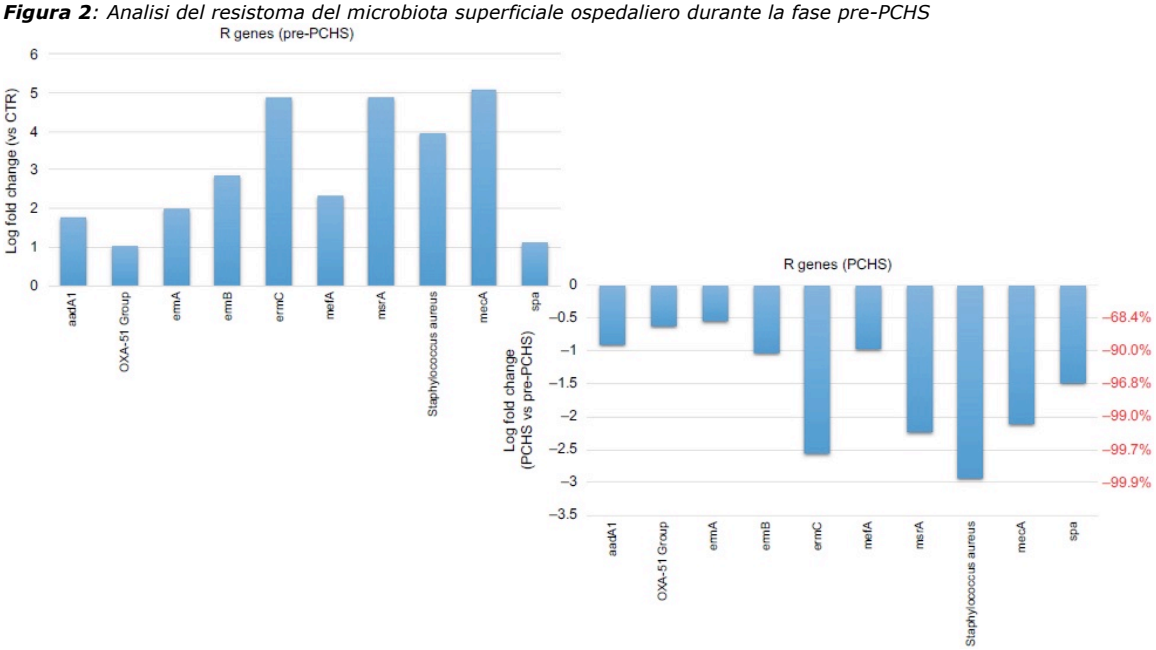
***Nota**: Il resistoma della popolazione contaminante superficiale è stato analizzato nel modo descritto nella sezione "Pazienti e metodi". I risultati della fase di pre-intervento (pre-PCHS, grafici a sinistra) e di intervento (PCHS, grafici a destra) sono qui mostrati per ciascun setting (Ospedali 1, 2, 3, 4 e 5). I risultati della fase pre-PCHS sono espressi come il log_{10} del fold change di ciascun gene R riscontrato a confronto con il controllo negativo (NTC) ed i risultati della fase PCHS sono espressi come il log_{10} del fold change di ciascun gene R riscontrato a confronto con la fase pre-PCHS. I dati graficati sono riferiti a valori medi ottenuti tramite campagne*

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

di campionamento ambientale mensili (12 in tutto) per ciascun punto di campionamento (18 punti campionati ad ogni campagna di campionamento per ciascun ospedale).

Limitando le analisi esclusivamente ai geni R maggiormente rilevati negli ambienti sottoposti a monitoraggio (ovvero, quelli le cui quantità erano almeno di 1 *log* più alte rispetto al controllo negativo), appare come l'introduzione del PCHS sia associata ad un significativo 70%-99% di loro decremento, a seconda del tipo di gene R (*Figura 2*). Inoltre, dato che la contaminazione stafilococcica si è dimostrata prevalente in tutti gli ospedali coinvolti e per l'importante ruolo di *S. aureus* nello sviluppo di ICA, abbiamo anche esaminato la sensibilità agli antibiotici di tutti i ceppi di *S. aureus* isolati dalle superfici ospedaliere durante lo studio. Per cui, tutti gli isolati di *S. aureus* sono stati analizzati effettuando antibiogrammi secondo il metodo Kirby–Bauer, come descritto nella sezione "Pazienti e metodi".

***Figura 2**: Analisi del resistoma del microbiota superficiale ospedaliero durante la fase pre-PCHS*



***Note**: Il resistoma della popolazione contaminante superficiale è stato analizzato nel modo descritto nella sezione "Pazienti e metodi". I risultati della fase di pre-intervento (pre-PCHS) sono qui graficati secondo la prevalenza dei geni R. I risultati sono i valori medi per tutti e 5 gli ospedali coinvolti, ottenuti tramite campagne di campionamento ambientale mensili (6 in tutto) per ciascun punto di campionamento (18 punti campionati ad ogni campagna di campionamento per ciascun ospedale).*

I risultati, riportati nella *Tabella 2*, hanno mostrato che, a confronto con quelli rilevati durante la fase di pre-intervento, gli isolati di *S. aureus* provenienti dalla fase di post-intervento erano per il 63.9%–93.5% meno resistenti agli antibiotici, a seconda del tipo di antibiotico testato. Inoltre, è stata osservata una diminuzione generale del 72.4% di isolati di *S. aureus* multiresistenti (MDR, Multi-Drug Resistant, ossia ceppi resistenti a tre o più antibiotici), passata da 58/81 (71.6%) nella fase pre-PCHS a 16/30 (53.3%) nella fase di impiego del prodotto. Abbiamo inoltre analizzato la presenza del gene di resistenza alla colistina colR mediata dal plasmide *mcr-1*, che non era inclusa nell'analisi tramite microarray. I risultati hanno rivelato che, in contrasto con la fase di pre-intervento, nella quale 21/223 (9.2%) dei batteri gram-negativi possedevano il plasmide *mcr-1*, solo 6/229 (2.6%) di questi isolati, rilevati nella fase di intervento, si sono dimostrati positivi per la presenza di tale plasmide. Tutti i ceppi positivi tramite PCR, hanno dimostrato valori di MIC variabili da 4 a 16 mg/L nella microdiluizione in brodo di coltura ed esibivano il fenotipo MDR, essendo resistenti a tre o più antibiotici.

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

***Tabella 2**: Resistenza agli antibiotici in isolati di Staphylococcus aureus provenienti sia dalla fase pre-PCHS che dalla fase PCHS.*

Study period	Isolates (n)	Resistant isolates						
		Penicillin G	Ampicillin	Vancomycin	Oxacillin	Cefotaxime	Imipenem	MDR[a]
Pre-PCHS	81	53 (65.4%)	58 (71.6%)	31 (38.2%)	50 (61.7%)	61 (75.3%)	42 (51.8%)	58 (71.6%)
PCHS	30	18 (60.0%)	20 (66.6%)	2 (6.6%)	18 (60.0%)	22 (73.3%)	13 (43.3%)	16 (53.3%)
% Decrease (strain number)		–66.0	–65.5	–93.5	–64.0	–63.9	–69.0	–72.4

***Nota[a]**: Sono definiti MDR i ceppi resistenti a tre o più antibiotici. Penicillina G (10 IU), ampicillina (10 μg), vancomicina (30 μg), oxacillina (1 μg), cefotaxime (30 μg), imipenem (10 μg)*

IMPATTO DEL METODO DI SANIFICAZIONE A BASE PROBIOTICA SUL CONSUMO DEI FARMACI ANTIMICROBICI:

I dati riguardanti le terapie antibiotiche sono stati disponibili per 274 su 284 pazienti colpiti da ICA nella fase pre-PCHS (su 5930 pazienti totali monitorati) e per 124 su 128 pazienti con ICA durante la fase di impiego del PCHS (su 5531 pazienti monitorati). La *Tabella 3* confronta i farmaci antimicrobici somministrati a questi pazienti in termini di numero di prescrizioni e di durata della terapia (espressa in giorni). Tra gli antibiotici utilizzati, i β-lattamici (somministrati con o senza inibitore della β-lattamasi) ed i fluorochinoloni si sono dimostrati prevalenti, attestandosi al 58.8% del numero totale di farmaci somministrati ed al 55.8% dei giorni totali di terapia. Degno di nota è il fatto che l'introduzione del PCHS è risultata associata ad una diminuzione generale di impiego di farmaci pari al 60.3% rispetto alla fase di pre-intervento (con un range del 40.5%–90.9%, a seconda del tipo di farmaco). I 274 pazienti provenienti dalla fase pre-PCHS, svilupparono 289 episodi di ICA, mentre i 124 pazienti monitorati durante la fase di impiego del PCHS ne svilupparono 128; Il numero medio di giorni di terapia per ciascun paziente è stato, rispetto alle due fasi, di 12,2 e 11,1 (–9%), mentre, riferendosi a ciascun episodio di ICA, è stato di 11, 8 e 10,8 giorni (–8.5%). Le differenze riscontrate, però, non si sono rivelate statisticamente significative.

***Tabella 3**: Consumo di farmaci e giorni di terapia durante le fasi di monitoraggio pre-PCHS e PCHS*

Drug types	Molecules (n)		Therapy days (n)	
	Pre-PCHS	PCHS	Pre-PCHS	PCHS
β-Lactams[a]	126	75 (–40.5%)	1,140	711 (–37.6%)
Fluoroquinolones	111	20 (–82%)	723	102 (–85.9%)
Glycopeptides	43	18 (–58.1%)	442	178 (–59.7%)
Cephalosporins	43	22 (–48.8%)	354	136 (–61.6%)
Antifungals	31	6 (–80.6%)	287	41 (–85.7%)
Acid antibiotics	11	1 (–90.9%)	68	2 (–97.1%)
Polymixins	7	3 (–57.1%)	85	56 (–34.1%)
Sulfamides	6	1 (–83.3%)	43	9 (–79.1%)
Aminoglycosides	5	2 (–60.0%)	39	27 (–30.8%)
Others	16	9 (–43.7%)	112	98 (–12.5%)
Total	403	160 (–60.3%)	3,339	1,382 (–58.6%)

***Nota[a]**: con o senza inibitori delle β-lattamasi*

IMPATTO DEL METODO DI SANIFICAZIONE A BASE PROBIOTICA SUL COSTO DEI FARMACI ANTIMICROBICI UTILIZZATI IN RELAZIONE AD ICA:

In base ai dati ottenuti riguardo all'impego di farmaci in associazione a sviluppo di ICA in ciascun ospedale coinvolto nella sperimentazione, abbiamo valutato i costi diretti correlati alla somministrazione di terapie antibiotiche per il trattamento di ICA, espressi in costo giornaliero. Le analisi economiche si sono concentrate sui 398 pazienti che avevano sviluppato almeno una ICA durante l'ospedalizzazione e la cui storia clinica riportava i dati

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

completi riguardo la terapia farmacologica, da cui sono emersi 298 casi di ICA in 274 pazienti durante la fase di pre-intervento e 128 casi di ICA in 124 pazienti durante la fase di utilizzo del PCHS. I pazienti di sesso maschile rappresentavano il 43,1% ed il 44,4% del totale, rispettivamente nella fase pre-PCHS e PCHS, e l'età media era di 76±12,3 anni nella fase pre-PCHS e di 78.7±11,3 anni nella fase post-PCHS (*Tabella S1*). I costi giornalieri sono stati disponibili per 281 su 289 episodi di ICA nella fase pre-PCHS e per 127 su 128 casi di ICA nella fase PCHS. L'analisi dei dati ha rivelato che il costo medio per la gestione di un singolo episodio di ICA si è abbassato, passando da 213,7±915,3 € (Q1, 4,5; mediana, 17,7; Q3, 63,3) nella fase pre-PCHS (nella quale erano impiegati prodotti sanificanti a base di cloro) a 116.3±249.9 € (Q1, 6,0; mediana, 25,0; Q3, 64,4) nella fase PCHS, rappresentando un 45,6% di riduzione dei costi per episodio di ICA. Le differenze rilevate, però, non sono state statisticamente significative. Considerando il numero totale di pazienti che avevano contratto una o più ICA, l'impatto economico generale delle terapie impiegate in tali casi è stato di € 60,062.17 € durante la fase pre-PCHS e di 14,767.16 € nella fase PCHS, somma che rappresenta un 75,4% di riduzione dei costi totali riferiti alle terapie antimicrobiche dall'introduzione del PCHS, rispetto alla fase pre-PCHS.

Tabella S1: Caratteristiche demografiche dei pazienti

Patients	Pre-PCHS	PCHS	Differences
	No. (%)	No. (%)	*P*-value
Total	274	124	
Gender (male)	118 (43.1%)	55 (44.4%)	n.s.
Age (years ± SD)	76.0±12.3	78.7±11.3	0.025

DISCUSSIONE

L'AMR rappresenta una delle maggiori minacce per la salute umana, e la persistente contaminazione degli ambienti ospedalieri agisce come serbatoio per i patogeni responsabili dello sviluppo di ICA. Il controllo della contaminazione ambientale è una difficile impresa ed i metodi di sanificazione convenzionali sinora utilizzati, sebbene applicati con buone intenzioni, permettono la ricontaminazione e possono favorire la selezione di ceppi resistenti. I nostri risultati mostrano che l'uso del PCHS è associato ad una diminuzione significativa di tutti i geni R presenti nel microbiota superficiale degli ospedali monitorati, indipendentemente dalle tipologie di microrganismi resistenti originariamente presenti in ciascun ambiente oggetto di studio ($Pc<0.01$). Tale riduzione è stata particolarmente evidente per i geni che erano molto rappresentati, in tutti e 5 gli ospedali coinvolti, nella fase pre-PCHS, ovvero, i geni *mecA* (codificanti per la resistenza alla meticillina), *aad1* (resistenza agli amminoglicosidi, spesso presente in *S. aureus*), il gruppo *OXA-51* (β-lattamasi, oxacillinasi), i geni *ermA-B-C* (codificanti per la resistenza ai macrolidi, lincosamidi e alla streptogramina B) e *mefA* e *msrA* (entrambi codificanti per la resistenza ai macrolidi). Questi dati sono stati confermati dai risultati ottenuti sugli isolati di *S. aureus* attraverso analisi mediante antibiogrammi tradizionali, dato che l'introduzione del PCHS è stata accompagnata da una riduzione del 61,9%–93,5% dei ceppi resistenti isolati, a seconda del tipo di antibiotico, e da un decremento totale del 73,7% nel numero dei ceppi resistenti a tre i più antibiotici. Anche tipologie meno comuni di AMR sono state influenzate dall'utilizzo del PCHS, inclusa colR (dovuta alla presenza del plasmide *mcr-1*) che ha subito una diminuzione del 77,1% a confronto di quanto rilevato nella fase pre-PCHS. Anche se piuttosto rara, questo tipo di antibiotico-resistenza rappresenta una seria minaccia per i pazienti, dato che la colistina è considerata l'ultima risorsa in caso di infezioni causate da batteri gram-negativi multi o pan-resistenti, poiché la sua presenza rende inefficace ogni opzione terapeutica. Prove di funzionalità, eseguite

CIAS
Centro ricerche Inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di Ambienti confinati ad elevata Sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution
in high sterile rooms

mediante microdiluizione, hanno confermato i risultati ottenuti con metodologie molecolari, dimostrando la concomitante riduzione dei ceppi gram-negativi MDR, dato che tutti gli isolati colR esibivano lo stesso fenotipo di multiresistenza. In definitiva, questi dati sono coerenti rispetto al generale calo dei patogeni superficiali precedentemente rilevato[21,23] e suggeriscono che il PCHS sia capace antagonista in maniera non-specifica rispetto a tutti i patogeni comunemente riscontrati negli ambienti ospedalieri, rendendo perciò il ritrovamento di ceppi resistenti estremamente infrequente ed improbabile. In accordo con questo, abbiamo precedentemente riportato che il numero delle ICA è risultato fortemente diminuito (−52.0%)[23]. I nostri dati dimostrano una riduzione sia nell'impatto globale delle ICA (numero di pazienti con almeno una ICA: −52%; quantità di farmaci somministrati: −58.6%; costi: −75.4% e giorni di terapia: −58.6%) che nella gravità dei casi individuali di ICA (giorni di terapia: -8,5% e costi: - 45,6%). Questi dati mostrano che la diminuzione generale osservata in termini di durata della terapia e dei costi dipendono entrambi da un significativo calo di incidenza di ICA durante la fase di impiego del PCHS e suggeriscono, comunque, che potrebbero essere dipesi pure da una differenza di trattamenti terapeutici, necessari per la cura individuale di questo tipo di infezioni.

LIMITAZIONI

Il qui presente studio presenta alcune limitazioni che dovrebbero essere considerate. Infatti, anche se le analisi sono state effettuate su un grande numero di pazienti, fatto che rende molto probabilmente tali risultati rappresentativi della realtà clinica, le analisi dei dati sono state effettuate comparando gruppi di pazienti appartenenti alla fase pre-PCHS e PCHS, senza che ci fosse un *matching* degli stessi pazienti in queste due fasi. Per questo motivo, le caratteristiche cliniche dei pazienti appartenenti ai due gruppi potrebbero non essere del tutto identiche, portando ad una possibile discrepanza nei risultati. Inoltre, sono stati inclusi solo pazienti per i quali si avevano i dati terapeutici completi e questo potrebbe aver causato una sottostima del consumo totale di farmaci e dei costi. Ancora, le nostre analisi si sono focalizzate solo sul costo dei farmaci, ma altri parametri avrebbero dovuto essere inclusi per ottenere una stima esaustiva riguardante la gestione ed il trattamento delle ICA, come: il tipo di strumentazione medica impiegata, il costo giornaliero del personale ospedaliero ed il costo giornaliero del posto-letto. In più, la riduzione delle ICA potrebbe anche avere avuto un impatto sulla durata dell'ospedalizzazione e sui costi ad essa correlati. Prendendo in considerazione che ICA ed AMR aumentano ed aggravano le spese sanitarie, la durata della permanenza in ospedale, lo stato patologico ed il tasso di mortalità, i risultati del presente studio dovrebbero essere considerati come stime, in un'ottica conservativa e, dal punto di vista sanitario, del possibile risparmio che si potrebbe ottenere impiegando il PCHS nella pratica clinica.

CONCLUSIONI

I risultati descritti in questo studio indicano che un intervento ambientale basato sulla modulazione del microbiota può significativamente limitare la diffusione di AMR nell'ambiente ospedaliero, contribuendo a contenere il rischio infettivo e riducendo l'impiego di farmaci ed i costi a loro annessi. Suggeriscono, inoltre, che l'impiego del sistema PCHS può essere considerato come parte integrante delle strategie di prevenzione e controllo delle infezioni e che tale approccio dovrebbe essere ulteriormente esplorato in studi futuri, sia in diverse condizioni che per il suo impatto sulla diffusione di AMR.

DATA SHARING STATEMENT

Tutti i dati a supporto delle conclusioni di questo articolo sono ivi inclusi.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Dr. Filippo Berloco, il Prof. Gabriele Pellissero, la Dr.ssa Paola Antonioli, il Dr. Lorenzo Tognon, il Dr. Giovanni Villone ed il Dr. Nelso Trua per aver procurato i dati sui farmaci relativi agli ospedali oggetto di studio. Si ringrazia, inoltre, Maddalena Coccagna per il supporto tecnico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Gli autori escludono ogni possibile conflitto di interessi in questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

1. ECDC. Point Prevalence Survey of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals. Stockholm, Sweden: ECDC; 2013.

2. Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Diaz Ho¨gberg L. *Point Prevalence Survey of Healthcare Associated Infections and Antimicrobial use in European Acute Care Hospitals*. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control; 2013.

3. Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combescure C, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;377(9761):228–241.

4. Ferjani S, Saidani M, Amine FS, Boutiba Ben Boubaker I. A comparative study of antimicrobial resistance rates and phylogenetic groups of community-acquired versus hospital-acquired invasive *Escherichia coli*. *Med Mal Infect*. 2015;45(4):133–138.

5. OECD, Union E. *Health at a Glance: Europe 2016: State of the Health in the EU Cycle*. Paris: OECD Publishing; 2016.

6. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect*. 2007;65 (Suppl 2):50–54.

7. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis*. 2004;39(8):1182–1189.

8. Dancer SJ. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):665–690.

9. Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(7):687–699.

10. Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital acquired infection. *J Hosp Infect*. 2009;73(4):378–385.

11. Weber DJ, Anderson D, Rutala WA. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(4):338–344.

12. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006;6:130.

13. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus,

Clostridium difficile, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control*. 2010;38(5 Suppl 1):S25–S33.

14. Caselli E, D'Accolti M, Soffritti I, Piffanelli M, Mazzacane S. Spread of mcr-1-driven colistin resistance on hospital surfaces, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(9):1752–1753.

15. Rutala WA, Weber DJ. Selection of the ideal disinfectant. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;35(7):855–865.

16. Almatroudi A, Gosbell IB, Hu H, et al. *Staphylococcus aureus* drysurface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. *J Hosp Infect*. 2016;93(3):263–270.

17. Cornejo-Juárez P, Vilar-Compte D, Pérez-Jiménez C, Ñamendys-Silva SA, Sandoval-Hernández S, Volkow-Fernández P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J Infect Dis*. 2015;31:31–34.

18. Caini S, Hajdu A, Kurcz A, Borocz K. Hospital-acquired infections due to multidrug-resistant organisms in Hungary, 2005–2010. *Euro Surveill*. 2013;18(2):20352.

19. Vandini A, Temmerman R, Frabetti A, et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS One*. 2014;9(9):e108598.

20. Fauci VL, Costa GB, Anastasi F, Facciol AC. An innovative approach to hospital sanitization using probiotics: in vitro and field trials. *J Microb Biochem Technol*. 2015;7(3):5.

21. Caselli E, D'Accolti M, Vandini A, et al. Impact of a probiotic based cleaning intervention on the microbiota ecosystem of the hospital surfaces: focus on the resistome remodulation. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148857.

22. Caselli E. Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings. *Microb Biotechnol*. 2017;10(5):1079–1083.

23. Caselli E, Brusaferro S, Coccagna M, et al. Reducing healthcare associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: a multicentre, prospective, intervention study. *PLoS One*. 2018;13(7): e0199616.

24. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST; 2017 October 20, 2017. Available from: http://www.eucast.org/. Accessed July 24, 2018.

25. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. 2018. Available from: http://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/. Accessed July 24, 2018.

26. ECDC. European surveillance of healthcare associated infections in intensive care units; 2015. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/healthcare-associated-infections-hai-icuprotocol. pdf. Accessed July 24, 2018.