

## A.N.M.D.O.

# La rimodulazione del resistoma delle superfici ospedaliere: nuove prospettive di contrasto alle Infezioni Correlate all'Assistenza sanitaria ed ai fenomeni di antibiotico-resistenza

### Riassunto

Nella memoria vengono illustrati i risultati delle ricerche condotte sulla rimodulazione del resistoma delle superfici nosocomiali trattate con il sistema di sanificazione PCHS a base di probiotici. Viene mostrato che tale modalità di intervento determina, oltre che la compressione della carica batterica potenzialmente patogena, anche una forte riduzione (da 1 a 3 log) delle resistenze geniche agli antibiotici presenti su campo. Inoltre i dati del Laboratorio provinciale di Microbiologia dimostrano che in più di 4 anni di sperimentazione del sistema PCHS negli ospedali della Provincia di Ferrara (Arcispedale S. Anna di Ferrara, Arcispedale S. Anna di Cona, Nuovo San Giorgio di Ferrara, Ospedale del Delta, Ospedale di Argenta, Ospedale di Cento, Ospedale accreditato Quisisana), su 32.140 esami colturali positivi riguardanti circa 90.000 pazienti non è mai stato osservato alcun episodio infettivo sostenuto da *Bacillus subtilis*, *pumilus* e *megaterium* contenuti nel prodotto PCHS.

**Elisabetta Caselli\*<sup>1,2</sup>, Maddalena Coccagna<sup>2</sup>, Paola Antonioli<sup>3</sup>, Maria D'Accolti<sup>1,2</sup>, Luca Lanzoni<sup>2</sup>, Maria Teresa Camerada<sup>2,4</sup>, Pier Giorgio Balboni<sup>2</sup>, Dario Di Luca<sup>1,2</sup>, Sante Mazzacane<sup>2</sup>**

*1 Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara, Ferrara, Italia;*

*2 CIAS Centro ricerche interdipartimentale per il controllo dell'inquinamento in ambienti ad elevate sterilità, Università di Ferrara, Ferrara, Italia;*

*3 Dipartimento di Controllo e Prevenzione Infezioni e Gestione del Rischio, Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Anna, Ferrara*

*4 Dottorato di Ricerca in Architettura e Pianificazione Urbanistica (XXX ciclo), Dipartimento di Architettura, Università di Ferrara, Ferrara, Italia*

### PAROLE CHIAVE:

probiotici, PCHS, ICA, sanificazione

### INTRODUZIONE

La contaminazione delle superfici ospedaliere rappresenta un problema serio per le strutture sanitarie, sia a causa delle Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA), sia per lo sviluppo di fenomeni di resistenza agli antibiotici (AMR) da parte dei patogeni clinicamente rilevanti, con il conseguente allarme per la loro diffusione e per le possibili implicazioni negative sulla efficacia delle cure farmacologiche [1, 2].

Tale quadro descrittivo è reso ancora più critico se si esaminano i dati già disponibili in letteratura [3, 4], secondo cui i patogeni come lo *Staphylococcus aureus* Meticillino-Resistente (MRSA), gli *Enterococchi* Vancomicino-Resistenti (VRE), le *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* e persino i virus (p.es. Norovirus), mantengono la loro capacità infettiva sulle superfici inorganiche ed asciutte per un periodo che va da giorni a settimane [5, 6]; le spore di *Clostridium difficile* possono sopravvivere addirittura per mesi [7, 8, 9].

È quindi del tutto evidente che il controllo della contaminazione delle superfici nosocomiali rappresenta da un lato una necessità ineludibile, ma dall'altro lato implica anche l'esigenza di disporre di adeguati metodi di valutazione della efficacia dei sistemi di sanificazione adottati.

A quest'ultimo proposito, è opportuno sottolineare che una procedura di pulizia delle superfici nosocomiali è un'operazione la cui efficacia finale non è solo riconducibile all'impiego di particolari prodotti (chimici o biologici), ma è connessa soprattutto alla adozione di strumenti di lavoro, strategie,

metodi e processi gestionali del personale e organizzativi notevolmente complessi, che insieme determinano, per l'appunto, un "sistema di sanificazione" [10-12].

Recentemente è stata verificata su campo l'efficacia di un nuovo protocollo di sanificazione (denominato PCHS: Probiotic Cleaning Hygiene System) basato sull'uso di microrganismi non patogeni del genere *Bacillus* (in particolare *Bacillus subtilis*, *pumilus* e *megaterium*). Questo metodo si è rivelato infatti in grado di ridurre stabilmente nel tempo la contaminazione superficiale di diversi patogeni, confrontando i risultati con quelli ottenuti con l'utilizzo dei comuni disinfettanti a base di cloro [13, 14].

Questo studio ha lo scopo di illustrare l'impatto del protocollo PCHS sull'ecosistema del microbiota delle superfici ospedaliere, focalizzando l'attenzione sulle caratteristiche di resistenza agli antibiotici presenti nella popolazione batterica [15, 16].

In parallelo, è stata valutata la sicurezza delle specie di *Bacillus* impiegate, monitorandone sia la potenziale acquisizione nel tempo di resistenze genetiche, sia la loro eventuale presenza in pazienti affetti da ICA.

I risultati ottenuti hanno confermato che i *Bacillus* del PCHS inducono una rimodulazione del resistoma dei patogeni presenti sulle superfici nosocomiali, con un abbattimento del numero e della tipologia di resistenze geniche agli antibiotici già presenti nel microbiota delle superfici prima del trattamento con il nuovo sistema probiotico.

Nelle indagini condotte, i *Bacillus*-PCHS non hanno acquisito nel tempo geni di resistenza, dimostrando quindi la non propensione a scambi genici con altri batteri.

Negli studi paralleli su tutte le strutture nosocomiali trattate con il sistema PCHS, i *Bacillus* utilizzati non sono mai stati ritrovati nei pazienti ospedalizzati affetti da ICA (circa 90.000 pazienti in 4 anni).

## ORGANIZZAZIONE DELLA RICERCA

Questa sperimentazione è stata eseguita presso l'Ospedale Quisisana (Ferrara, Italia), dopo aver ottenuto l'approvazione del Comitato Etico Locale, e si è sviluppata in un arco di tempo di 6 mesi.

La struttura ospedaliera consiste di 2 piani, ciascuno composto da una lungodegenza, una unità geriatrica ed una unità per acuti. I campionamenti sono stati effettuati in 4 stanze scelte in modo casuale, ubicate in 2 differenti piani dell'ospedale.

Le procedure di sanificazione sono state eseguite con il sistema (PCHS; Copma srl, Italia), già descritto in precedenti lavori [17]. Sono stati eseguiti 2 campionamenti ambientali prima del trattamento con PCHS (T=0), ad una settimana di intervallo l'uno dall'altro. Successivamente, il campionamento ambientale è stato eseguito 1 sola volta al mese, per i successivi 6 mesi. In base ai risultati di precedenti studi sperimentali [13, 14, 18], ogni campionamento è stato eseguito 7 ore dopo la pulizia.

## CAMPIONAMENTO AMBIENTALE

I prelievi microbiologici sono stati condotti su 3 differenti tipologie di superfici (pavimento, pediera del letto e lavabo dei servizi igienici) ed è stata eseguita con metodi idonei alle analisi colturali e molecolari. Riguardo ai primi, il campionamento è stato eseguito in triplo, mediante piastre RODAC. Per le analisi molecolari si sono utilizzati tamponi di rayon sterili, precedentemente umidificati con terreno sterile liquido LB, delimitando un'area di campionamento di 10x10 cm (Copan, Brescia, Italia).

Mediante analisi colturale sono stati monitorati i seguenti microrganismi associati ad ICA: *Staphylococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium difficile*, *Candida spp.* ed *Aspergillus spp.* Sono stati raccolti, in doppio, 360 campioni microbiologici (720 in tutto).

I campionamenti molecolari hanno avuto due diversi scopi: da un lato valutare la presenza di ceppi di *Bacillus*-PCHS nei campioni clinici ed identificare i ceppi di *Bacillus* isolati dall'ambiente, dall'altro identificare e numerare le resistenze geniche agli antibiotici, sia per i *Bacillus* medesimi sia per la popolazione batterica contaminante [13]. La resistenza agli antibiotici dei *Bacillus* isolati è stata anche valutata, in parallelo, mediante il test di suscettibilità agli anti-

microbici di Kirby-Bauer per diffusione su piastra [19, 20]. A questo scopo sono stati testati 42 differenti antibiotici.

Prima dell'impiego dei detergenti a base di *Bacillus*-PCHS, le sequenze delle specie di *Bacillus*-PCHS sono state caratterizzate, così da poterle riconoscere a livello di sottospecie ed essere in grado di discriminarle facilmente dalle altre specie o sottospecie simili di *Bacillus* ambientali, potenzialmente riscontrabili sulle superfici campionate. La resistenza farmacologica dei ceppi di *Bacillus* contenuti nel detergente PCHS è stata caratterizzata sia tramite microarray che per mezzo di antibiogrammi tradizionali, mostrando, come atteso, la presenza di pochi geni R (gruppo OXA, *msrA*) conferenti resistenza alla penicillina e ai macrolidi, e confermando così i risultati precedentemente ottenuti [13, 14].

I ceppi di *Bacillus*-PCHS sono stati caratterizzati anche a livello biologico, valutando la capacità delle loro spore di germinare e colonizzare le superfici rigide e di competere con altre specie microbiche contaminanti la stessa area. I risultati ottenuti hanno indicato che le spore derivate dal *Bacillus*-PCHS abbiano la capacità di germinare sulle superfici inanimate asciutte, generando cellule batteriche in forma vegetativa.

### IMPATTO DEL SISTEMA PCHS SULLA COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA DELLE SUPERFICI OSPEDALIERE

L'impatto del sistema PCHS sulle superfici ospedaliere è stato valutato in termini di composizione del microbiota, prima (T0) e dopo l'introduzione della procedura di pulizia PCHS (T1, T2, T3, T4, con intervallo mensile). I campioni ambientali sono stati raccolti 7 ore dopo l'applicazione del detergente, così da permettere lo sviluppo di fenomeni di ricontaminazione e dunque essendo in grado di valutare la stabilità dell'effetto modulatore indotto dal PCHS sul microbiota. I risultati delle analisi microbiologiche hanno mostrato un forte calo del numero di CFU/m<sup>2</sup> per tutti i patogeni testati, con l'eccezione del gruppo delle *Enterobacteriaceae*, già scarsamente rappre-

sentato al T0 e perciò risultato non significativamente modulato nei tempi successivi. Questo calo era già evidente al T1 (1 mese dopo l'inizio dell'applicazione del PCHS), in modo più marcato per *Staphylococcus spp.*, e si è mantenuto stabile nel tempo per tutto il successivo periodo di applicazione del PCHS (4 mesi).

In sintesi, le CFU/m<sup>2</sup> sono diminuite del 98% rispetto al T0. Queste differenze sono risultate statisticamente significative ( $p \leq 0,0001$ ) a tutti i tempi testati e per tutti i gruppi, con l'eccezione delle *Enterobacteriaceae*. A causa del ridotto numero di CFU rilevato per la popolazione dei miceti, la loro presenza è stata analizzata mediante PCR quantitativa (qPCR), specifica per *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* e *Fusarium spp.*, allo scopo di quantificare il numero dei loro rispettivi genomi. Al T0 è stata osservata una forte contaminazione da parte di *Candida spp.* ( $6,5 \times 10^3$  genomi/100 cm<sup>2</sup>), mentre le specie di *Aspergillus* e *Fusarium* sono risultate molto scarse (40 e 5 genomi/100 cm<sup>2</sup>, rispettivamente).

Il trattamento con PCHS ha indotto un forte e stabile calo della presenza di *Candida* (0.25 genomi/100 cm<sup>2</sup> al T4, corrispondente a più del 99% di calo) e della presenza di *Aspergillus* (2.6 genomi/100 cm<sup>2</sup> al T4, pari a circa il 93% di riduzione), mentre la scarsa presenza di *Fusarium* è risultata non influenzata dal trattamento con PCHS. Le differenze misurate sono risultate tutte statisticamente molto significative ( $p \leq 0,0001$ ). Come atteso, le analisi molecolari simultanee eseguite tramite due diverse qPCR (panB-qPCR, che rileva tutti i batteri e spo0A-qPCR, specifica per *Bacillus*) sul DNA estratto dagli stessi campioni ambientali, hanno rivelato un concomitante aumento nel tempo del numero di cellule batteriche di *Bacillus* [21, 22].

I *Bacillus*-PCHS hanno quindi l'abilità di competere con il microbiota presente sulla superficie ospedaliera, rimpiazzando le specie microbiche patogene originariamente presenti sulle superfici. Si mette in evidenza come l'incremento dei *Bacillus*-PCHS risulti stabile nel tempo e rilevabile in tutti i campioni, indipendentemente dal tipo di superficie testata.

Resistance gene	Drug	Bacteria
AAC(6)-Ib-cr	Fluoroquinolones (ciprofloxacin)	Enterobacteriaceae ( <i>K. pneumoniae</i> )
IMI & NMC-A	Carbapenemase	Enterobacteriaceae ( <i>K. pneumoniae</i> )
SHV(156D)	ESBLs	Enterobacteriaceae
SHV(156G)	ESBLs	Enterobacteriaceae
SHV (238G240E)	ESBLs	Enterobacteriaceae
SHV (238G240K)	ESBLs	Enterobacteriaceae
SHV(238S240E)	ESBLs	Enterobacteriaceae
SHV(238S240K)	ESBLs	Enterobacteriaceae
ccrA	Recombinase (mec cassette)	Staphylococci, Enterobacteriaceae
VIM-1 group	Metallo $\beta$ -lactamase	Enterobacteriaceae
VIM-13	Metallo $\beta$ -lactamase	Enterobacteriaceae
OXA-50 group	Carbapenemase	Gram negative
OXA-51 group	Carbapenemase	Gram negative
ermA	Macrolides (Erythromycin)	Staphylococci, Streptococci
ermB	Macrolides (Erythromycin)	<i>Bacillus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
ermC	Macrolides (Erythromycin)	<i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Staphylococcus</i>
mefA	Macrolides (efflux pump)	<i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
msrA	Macrolides (efflux pump)	<i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
opm	Multidrug resistance efflux pump	<i>Pseudomonas</i>
tetB	Tetracyclin (efflux pump)	<i>Escherichia</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i>
mecA	$\beta$ -lactamase, methicillin	<i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>

doi:10.1371/journal.pone.0148857.t001

**Tabella 1.** Geni conferenti resistenza rilevati nel microbiota sulle superfici ospedaliere [Fonte: journal.pone.0148857.t001].

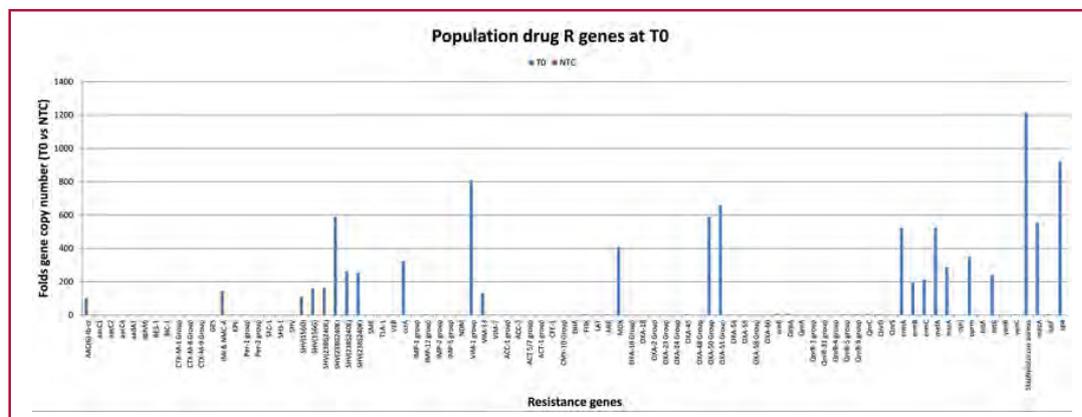
## IMPATTO DEL SISTEMA PCHS SULLE FARMACO-RESISTENZE DEL MICROBIOTA DELLE SUPERFICI OSPEDALIERE

Per caratterizzare il profilo di antibiotico-resistenza dell'intero microbiota contaminante le superfici ospedaliere, il DNA microbico totale estratto dalla popolazione superficiale totale è stato analizzato utilizzando un qPCR microarray, capace di rilevare e quantificare simultaneamente 84 differenti geni conferenti farmaco-resistenza (R), rappresentativi di tutte le classi di antibiotici. Grazie a questo metodo, è stato possibile valutare il resistoma dell'intera popolazione, anziché analizzare solo singole specie, fornendo così importanti informazioni sulle resistenze totali originariamente presenti nel microbiota residente e su ogni potenziale variazione del loro pattern.

I risultati mostrano che al T0 (prima dell'uso del metodo di pulizia PCHS), nel microbiota è stato possibile rilevare la presenza di diversi geni R, associati a resistenza ai  $\beta$ -lattamici, macrolidi, chinoloni e meticillina. La Tabella 1 e la Fig. 1 elencano i geni R più rappresentativi rilevati al tempo al T0. In particolare, sono risultati particolarmente abbondanti gli Stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA). Dopo

1 mese di applicazione del PCHS, infatti, tutti i geni R originariamente rilevati al T0 risultavano marcatamente diminuiti, come misurato tramite analisi comparative normalizzate dei due campioni ambientali (Tabella 2). In parallelo, anche gli Stafilococchi mostravano un forte decremento (circa 3 logaritmi) se confrontati al controllo T0. I dati raccolti ai successivi tempi di campionamento (T2, T3 e T4) hanno confermato i risultati osservati dopo il primo mese (T1). L'unica eccezione è stata osservata per il gene *msrA*, che è risultato leggermente aumentato a tutti i tempi testati, come atteso, dal momento che i *Bacillus* del PCHS contengono una resistenza cromosomica costitutiva *msrA*.

Inoltre, il microarray ha mostrato una forte diminuzione degli Stafilococchi e dei geni codificanti per la resistenza alla meticillina loro associati, confermando a livello molecolare i dati ottenuti da test microbiologici tradizionali, in questo ed in studi precedenti [13, 14, 22]. Si rammenta che i risultati esposti in Tabella 2 sono su scala logaritmica; pertanto una riduzione di 2log o 3log corrisponde rispettivamente a una riduzione di 100 e 1.000 volte della popolazione genica farmaco resistente. In parallelo, è stata valutata l'eventuale nuova acquisizione di resistenze da parte dei ceppi di



**Fig 1.** Geni di farmaco-resistenza R al T0 [Fonte: DOI:10.1371/journal.pone.0148857; Supporting Information S1].

*Bacillus*-PCHS presenti sulle superfici trattate (mediante analisi molecolare di 20 isolati di *Bacillus*), mostrando che non si è verificata alcuna nuova acquisizione di geni R, confermando che questi batteri non sono inclini a fenomeni di trasferimento genico [13, 14, 22]. In conclusione, i *Bacillus*-PCHS hanno determinato una marcata riduzione della frazione di patogeni farmaco-resistenti nella popolazio-

ne contaminante le superfici, senza peraltro acquisire alcun nuovo carattere di resistenza durante tutto il periodo di studio. Questi risultati, unitamente alla generale diminuzione dei geni R nella popolazione contaminante, suggerisce che l'acquisizione di caratteristiche indesiderate è da considerarsi un evento assai poco probabile, nonostante lo stretto contatto dei Bacilli con altre specie microbiche, ed

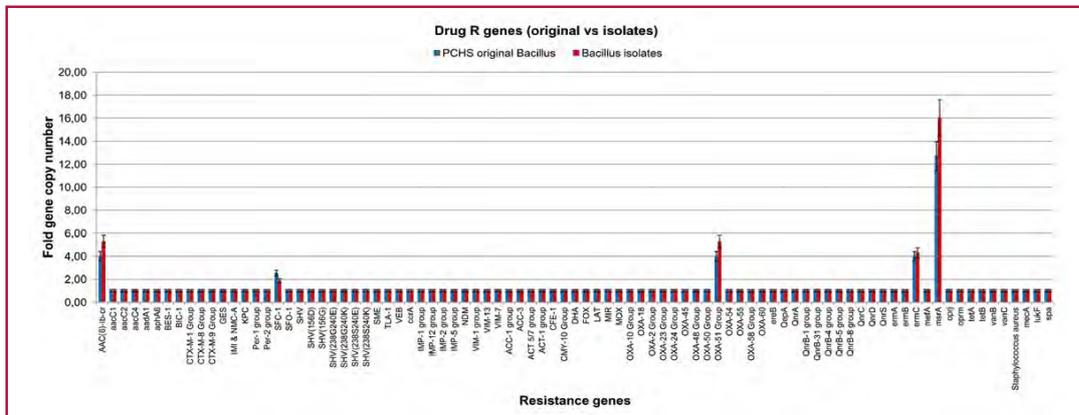
**Tabella 2.** Impatto del sistema PCHS sui geni di resistenza agli antibiotici R del microbiota delle superfici ospedaliere [Fonte: journal.pone.0148857.t002]

Resistance gene	Sampling time vs T0*			
	T1	T2	T3	T4
AAC(6)-Ib-cr	-3.39	-2.11	-5.74	-3.55
IMI & NMC-A	-2.98	-7.94	-5.17	-5.17
SHV(156D)	-2.00	-4.19	-2.72	-2.74
SHV(156G)	-2.00	-4.19	-2.72	-2.74
SHV(238G240E)	-2.00	-4.19	-2.72	-2.74
SHV(238G240K)	-2.00	-4.19	-2.72	-2.74
SHV(238S240E)	-2.00	-4.19	-2.72	-2.74
SHV(238S240K)	-2.00	-4.19	-2.72	-2.74
ccrA	-3.21	-8.56	-5.56	-5.57
VIM-1 group	-5.68	-15.27	-10.24	-9.95
VIM-13	-3.73	-10.40	-6.76	-6.77
MOX	-2.28	-6.06	-3.94	-3.95
OXA-50 Group	-3.42	-8.79	-5.99	-6.00
OXA-51 Group	-2.00	-2.85	-3.07	-3.03
ermA	-5.22	-111.84	-8.94	-8.32
ermB	-7.92	-4.09	-120.19	-20.10
ermC	-4.34	-16.44	-1.82	-13.06
meIA	-28.75	-54.15	-103.11	-99.27
msrA	+3.41	+1.13	+2.63	+1.40
oprM	-2.22	-5.90	-3.84	-3.84
tetB	-2.37	-2.96	-4.11	-4.11
mecA	-6.85	-11.52	-10.28	-17.52
<i>S. aureus</i>	-1240.94	-24.38	-88.62	-218.5
spa	-950.70	-404.79	-218.09	-510.25

\*Results are expressed as fold differences for each gene, after normalization for bacterial DNA amount and comparison with Ct values at T0.

doi:10.1371/journal.pone.0148857.t002

\* Le variazioni rispetto a T0 sono espresse come numero di volte dopo normalizzazione per la quantità totale del DNA batterico.



**Fig 2.** Geni di farmaco-resistenza R da isolati di Bacillus-PCHS confrontati con quelli provenienti da Bacilli-PCHS originari [Fonte: journal.pone.0148857.g007]

avvalora quindi la sicurezza di impiego dei prodotti a base di *Bacillus*. Il DNA estratto da *Bacilli* PCHS isolati sul campo è stato analizzato mediante qPCR Microarray. I risultati sono espressi come differenza media del numero di copie di geni rilevati in isolati di *Bacillus* dopo 1, 2, 3, 4 mesi dall'inizio del trattamento, confrontati con quelli ottenuti da *Bacillus*-PCHS originari contenuti nei detersivi.

## LA SICUREZZA DEL SISTEMA PCHS

Nonostante sia nota la apatogenicità dei *Bacillus*-PCHS (*subtilis*, *pumilus* e *megaterium*) nei confronti dell'uomo, è evidente la necessità di condurre studi sistematici sulla sicurezza di questa modalità di sanificazione. Nelle analisi condotte in ospedali che già utilizzano il sistema PCHS da molto tempo (anche 4 anni), i *Bacillus* prelevati sul campo non hanno mai mostrato alcuna mutazione genetica o acquisizione di nuovi caratteri di resistenza, mostrando di possedere una elevata stabilità genetica. D'altra parte, nei campioni biologici (sangue e urine) di 6 pazienti esaminati presso l'Ospedale Quisisana ed interessati da un evento infettivo, non è stata trovata traccia dei *Bacillus* nemmeno utilizzando metodiche di analisi molecolare estremamente sensibili. Negli ospedali della provincia di Ferrara che impiegano il sistema PCHS (da 1 fino a 4 anni di trattamento), è stata avviata la sorveglianza microbiologica dei pazienti così da evidenziare la comparsa di eventi infettivi sostenuti dai *Bacillus subtilis*, *pumilus* e *megaterium*, inserendo questo monitoraggio continuo nel sistema di allerta di cia-

scuna struttura, grazie al fatto che afferiscono tutte ad un unico Laboratorio di Microbiologia. È stato quindi possibile estrarre i dati relativi a tutti gli esami con esito positivo effettuati sui campioni biologici di pazienti con sospetta colonizzazione o infezione, ricoverati nei periodi considerati (cioè dal momento in cui ogni nosocomio ha attivato il sistema PCHS).

I risultati dell'indagine hanno mostrato che, in oltre 4 anni di sperimentazione e analisi diretta sul campo del sistema PCHS negli ospedali coinvolti (Arcispedale S. Anna di Ferrara, Arcispedale S. Anna di Cona, Nuovo S. Giorgio di Ferrara, Ospedale del Delta, Ospedale di Argenta, Ospedale di Cento, Ospedale accreditato Quisisana), su 32.140 esami colturali positivi non è mai stato osservato alcun episodio infettivo sostenuto da *Bacillus subtilis*, *pumilus* e *megaterium* contenuti nel prodotto e quindi riconducibile alla tecnica di sanificazione descritta [23, 24]. Analizzando i dati relativi al numero di pazienti coinvolti, nei diversi ospedali in cui viene applicato il sistema PCHS, si può affermare che su circa 90.000 pazienti che hanno soggiornato in ambienti sanificati con prodotti probiotici, corrispondenti a circa 800.000 giornate di degenza, non si è verificato alcun evento imputabile ai *Bacillus*-PCHS.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mostrano che i ceppi di *Bacillus*, meglio noti per il loro impiego diffuso come integratori alimentari o fungicidi, possono essere ugualmente impiegati nelle procedure di sanificazione, allo scopo di contrastare la

crescita di patogeni e diminuire la popolazione portatrice di geni di farmaco-resistenza, un problema globale che è associato anche alla comparsa delle più gravi forme di ICA. Inoltre, i *Bacillus*-PCHS hanno mostrato di essere geneticamente stabili e totalmente apatogeni, durante i 4 anni di impiego in diversi nosocomi, a riprova del fatto che possono essere usati in sicurezza per le procedure di sanificazione. Lo studio dimostra infine l'importanza di condurre periodicamente test microbiologici colturali e molecolari nelle strutture ospedaliere [25-29], sia per misurare l'efficacia di azione del sistema di sanificazione adottato a 7 ore dalla sua applicazione e nel tempo, sia per quantificare la presenza di resistenze geniche agli antibiotici.

## RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato supportato finanziariamente da COPMA srl (Ferrara, Italia). I sovvenzionatori non hanno avuto nessun ruolo nella progettazione dello studio, raccolta ed analisi dei dati, nessun potere decisionale sulla pubblicazione o nella preparazione del manoscritto. Si ringrazia il personale dell'Ospedale Quisisana (Dr. P. Coppola, Dr. E. Cinchini, Dr. M. Martini, M.C. Gnani, H. Z. Valencia Serna, G. Piacentini, M. Fedozzi) per la grandissima disponibilità mostrata e per l'assistenza tecnica.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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. 2011-2012. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control. 2013; doi 10.2900/86011
2. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect.* 2007; 65 Suppl 2:50-4. Epub 2007/08/19. doi: S0195-6701(07)60015-2 [pii] doi: 10.1016/S0195-6701(07)60015-2 PMID: 17540242.
3. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis.* 2004; 39(8):1182-9. Epub 2004/10/16. doi: CID33640 [pii] doi: 10.1086/424667 PMID: 15486843.
4. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006; 6:130. Epub 2006/08/18. doi: 1471-2334-6-130 [pii] doi: 10.1186/1471-2334-6-130 PMID: 16914034; PubMed Central PMCID: PMC1564025.
5. Goodman ER, Platt R, Bass R, Onderdonk AB, Yokoe DS, Huang SS. Impact of an environmental cleaning intervention on the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on surfaces in intensive care unit rooms. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29(7):593-9. Epub 2008/07/16. doi: 10.1086/588566 PMID: 18624666; PubMed Central PMCID: PMC2670228.
6. Weber DJ, Rutala WA. Role of environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997; 18(5):306-9. Epub 1997/05/01. PMID: 9154471.
7. 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):S25-33. Epub 2010/07/01. doi: S0196-6553(10)00408-6 [pii] doi: 10.1016/j.ajic.2010.04.196 PMID: 20569853.
8. Weber DJ, Anderson DJ, Sexton DJ, Rutala WA. Role of the environment in the transmission of *Clostridium difficile* in health care facilities. *Am J Infect Control.* 2013; 41(5 Suppl):S105-10. Epub 2013/05/03. doi: S0196-6553(13)00020-5 [pii] doi: 10.1016/j.ajic.2012.12.009 PMID: 23622740.
9. Davies A, Pottage T, Bennett A, Walker J. Gaseous and air decontamination technologies for *Clostridium difficile* in the healthcare environment. *J Hosp Infect.* 2011; 77(3):199-203. Epub 2010/12/07. doi:S0195-6701(10)00411-1 [pii] doi: 10.1016/j.jhin.2010.08.012
10. Hall L, Farrington A, Mitchell BG, et al. Researching effective approaches to cleaning in hospitals: protocol of the REACH study, a multi-site stepped-wedge randomised trial. *Implementation Science: IS.* 2015;11:44. doi:10.1186/s13012-016-0406-6 PMID: 27009342
11. Carling PC, Bartley JM. Evaluating hygienic cleaning in health care settings: what you do not know can harm your patients. *Am J Infect Control.* 2010; 38(5 Suppl 1):S41-50. Epub 2010/07/01. doi: S0196-6553(10)00406-2 [pii] doi: 10.1016/j.ajic.2010.03.004 PMID: 20569855.

12. Dancer SJ. Hospital cleaning in the 21st century. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30(12):1473–81. Epub 2011/04/19. doi: 10.1007/s10096-011-1250-x PMID: 21499954
13. Vandini A, Temmerman R, Frabetti A, Caselli E, Antonioli P, Balboni PG, et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS One*. 2014; 9(9):e108598. Epub 2014/09/27. doi: 10.1371/journal.pone.0108598 PONE-D-14-19956 [pii]. PMID: 25259528; PubMed Central PMCID: PMC4178175.
14. Vandini A, Frabetti A, Antonioli P, Platano D, Branchini A, et al. (2014) Reduction of the Microbiological Load on Hospital Surfaces Through Probiotic-Based Cleaning Procedures: A New Strategy to Control Nosocomial Infections. *J Microbiol Exp* 1(5): 00027. DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00027
15. Cornejo-Juarez P, Vilar-Compte D, Perez-Jimenez C, Namendys-Silva SA, Sandoval-Hernandez S, Volkow-Fernandez P. The impact of hospital-acquired infections with multi-drug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J Infect Dis*. 2015; 31:31–4. Epub 2014/12/22. doi: S1201-9712(14) 01740-8 [pii] doi: 10.1016/j.ijid.2014.12.022 PMID: 25528484.
16. 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). Epub 2013/01/18. PMID: 23324427.
17. Vandini A, Antonioli P, Lanzoni L, Camera-da MT, Coccagna M, Branchini A, Platano D, Balboni PG, Mazzacane S, Il sistema di sanificazione PCHS Probiotic Cleaning Hygien System: risultati delle indagini sperimentali in vitro ed in campo, *L'ospedale*, 03/2014, pp.48-62.
18. La Fauci V, Costa GB, Anastasi F, Facciola A, C. GO, Squeri R. An Innovative Approach to Hospital Sanitization Using Probiotics: In Vitro and Field Trials. *Microbial & Biochemical Technology*. 2015; 7 (3):5. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000198>.
19. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45(4):493–6. Epub 1966/04/01. PMID: 5325707.
20. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 20th Informational Supplement M100-S20*. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). 2010.
21. Wu XY, M.J. W, Hornitzky M, Chin J. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *J Microbiol Methods*. 2006; 64 (1):107–19. PMID: 15979744
22. Wattiau P, Renard M- E, Ledent P, Debois V, Blackman G, Agathos SN. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001; 56:816–9. PMID: 11601635
23. 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:e0148857.
24. Caselli E, Antonioli P, Mazzacane S, Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation *J Hosp Infect.*, 2016; 94(2):193-194, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.06.021>.
25. Carling PC, Parry MF, Von Beheren SM. Identifying opportunities to enhance environmental cleaning in 23 acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29(1):1–7. Epub 2008/01/04. doi: 10.1086/524329 PMID: 18171180.
26. Boyce JM, Havill NL, Havill HL, Mangione E, Dumigan DG, Moore BA. Comparison of fluorescent marker systems with 2 quantitative methods of assessing terminal cleaning practices. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011; 32(12):1187–93. Epub 2011/11/15. doi: 10.1086/662626 PMID: 22080657.
27. Huslage K, Rutala WA, Gergen MF, Sickbert-Bennett EE, Weber DJ. Microbial assessment of high-, medium-, and low-touch hospital room surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013; 34(2):211–2. Epub 2013/01/09. doi: 10.1086/669092 PMID: 23295570.
28. Cookson B, Mackenzie D, Kafatos G, Jans B, Latour K, Moro ML, et al. Development and assessment of national performance indicators for infection prevention and control and antimicrobial stewardship in European long-term care facilities. *J Hosp Infect*. 2013; 85(1):45–53. Epub 2013/08/13. doi: S0195-6701(13)00194-1 [pii] doi: 10.1016/j.jhin.2013.04.019 PMID: 23932737.
29. Vandini A, Antonioli P, Lanzoni L, Camera-da MT, Balboni PG, Coccagna M, Mazzacane S, Proposta di nuovi indicatori di igiene ambientale, *L'ospedale*, 03/2014, pp.64-75.