

Biocontrollo delle Superfici in Ospedali che utilizzano Prodotti Pulenti a Base Microbica¹

Alberta Vandini¹, Robin Temmerman^{2,3}, Alessia Frabetti¹, Elisabetta Caselli⁴, Paola Antonioli⁵, Pier Giorgio Balboni⁴, Daniela Platano⁶, Alessio Branchini⁷, Sante Mazzacane^{1*}

1 CIAS Laboratory, Centro di Studio della Contaminazione Fisica, Chimica e Microbiologica in Ambienti ad Elevata Sterilità, Dipartimento di Architettura, Università di Ferrara, Ferrara, Italia; 2 Laboratorio di Ecologia Microbica e Tecnologia, Università di Ghent, Ghent, Belgio; 3 Chrisal R & D Department, Lommel, Belgio; 4 Dipartimento di Scienze Mediche, Sezione di Microbiologia, Università di Ferrara, Ferrara, Italia; 5 Dipartimento di Controllo e Prevenzione Infezioni e Gestione dei Rischi, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Italia; 6 Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna, Bologna, Italia; 7 Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università di Ferrara, Ferrara, Italia

*corresponding author: mzs@unife.it

Abstract

Background

Le Infezioni Correlate all'Assistenza sanitaria (ICA) rappresentano una delle più frequenti complicazioni che si manifestano nelle strutture sanitarie. Le superfici ambientali contaminate rappresentano un'importante potenziale fonte di trasmissione di molti patogeni "ospedale-associati", il che indica il bisogno di strategie di decontaminazione innovative e sostenibili.

Scopo

Lo scopo di questo studio è valutare l'effetto di una nuova procedura di pulizia, basata sul meccanismo del biocontrollo, sulla presenza e sopravvivenza di diversi microorganismi responsabili di ICA (ovvero coliformi, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* e *Candida albicans*) sulle superfici rigide in ambiente ospedaliero.

Metodi

L'effetto del metodo di pulizia microbica, a base di spore dei probiotici *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*, è stato valutato mediante confronto diretto con i protocolli di pulizia convenzionali per 24 settimane in tre ospedali tra loro indipendenti (uno in Belgio e due in Italia), raccogliendo circa 20000 campioni microbici provenienti dalle superfici.

Risultati

La pulizia microbica, come parte integrante del protocollo di pulizia giornaliero, ha portato ad una riduzione dei patogeni ICA-correlati del 50-89% in più rispetto ai metodi tradizionali. Quest'effetto è stato raggiunto dopo 3-4 settimane e la riduzione della carica patogena è rimasta stabile nel tempo. Inoltre, alternando l'utilizzo di metodi di pulizia microbici e tradizionali, si è evidenziato che l'effetto era direttamente correlato alla nuova procedura, come indicato dall'aumento delle CFU/m² nel momento in cui la pulizia a base di probiotici veniva rimpiazzata da metodi tradizionali. Sebbene restino aperti numerosi quesiti riguardanti i meccanismi d'azione coinvolti, questo studio dimostra che il sistema di pulizia microbico rappresenta un'alternativa efficace ed eco-sostenibile all'uso di detergenti clinici o disinfettanti non specifici nelle strutture sanitarie.

¹ Traduzione dell'articolo: Vandini A, Temmerman R, Frabetti A, Caselli E, Antonioli P, Balboni PG, et al. (2014) Hard Surface Biocontrol in Hospitals Using Microbial-Based Cleaning Products. PLoS ONE 9(9): e108598. doi:10.1371/journal.pone.0108598.

Conclusioni

Questo studio indica il metodo di pulizia a base di probiotici quale efficace strategia per un abbattimento stabile del numero di microorganismi correlati ad ICA sulle superfici. I primi risultati sugli attuali livelli di ICA, negli ospedali sede di studio, monitorati su base continua, sono molto promettenti e potrebbero aprire la strada ad una nuova ed economica strategia per contrastare o (bio)controllare i patogeni ospedale-associati.

Introduzione

Le Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA) costituiscono una delle più frequenti complicazioni che si manifestano in strutture sanitarie e rappresentano, in tutto il mondo, un complesso problema per quanto riguarda la sicurezza e la qualità del servizio sanitario [1], così come affermato in un recente studio dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, che ne stima una presenza pari all'8% negli ospedali dei paesi ad alto reddito[2]. Uno studio di prevalenza puntuale eseguito dall'ECDC (*European Center for Disease Control*) ha confermato che le infezioni associate alle cure sanitarie sono un grave problema riguardante la salute pubblica in Europa, con valori attestati al 5,7% (4,5-7,4%), il che significa, giornalmente, 81089 (64624-105895) pazienti con una ICA presenti negli ospedali europei [3]. In particolare, quest'indagine a livello europeo ha riportato stime simili di infezioni nosocomiali per quanto riguarda l'Italia ed il Belgio, dove la percentuale di pazienti con ICA è stata calcolata pari al 6,3% (5,4–7,4%) ed al 7,1% (6,1–8,3%), rispettivamente [1]. Basandosi su questi studi, la stima numerica totale annua di pazienti con ICA negli ospedali europei nel 2011-2012 è stata di 3,2 milioni, con un intervallo di confidenza da 1,9 a 5,2 milioni di pazienti. Un'incidenza simile è stata riscontrata negli Stati Uniti [4]. Oltre all'impatto sulla salute umana, la gestione delle ICA è associata a costi economici molto elevati. Infatti, come riportato dal Centro per il Controllo e Prevenzione delle Malattie (CDC), è stato stimato che la spesa medica totale annua, riguardante le infezioni correlate alle cure sanitarie negli ospedali negli Stati Uniti, varia da 35,7 a 45 miliardi di dollari [5]. Inoltre, la gestione, la prevenzione ed il monitoraggio delle ICA rappresenta, attualmente, una sfida per le strutture sanitarie [6,7]. I microrganismi più frequentemente isolati dai casi di ICA sono, in ordine decrescente, *Escherichia coli*, (15.9%), *Staphylococcus aureus* (12.3%), *Enterococcus spp.* (9.6%), *Pseudomonas aeruginosa* (8.9%), *Klebsiella spp.* (8.7%), *Stafilococchi coagulasi-negativi* (7.5%), *Candida spp.* (6.1%), *Clostridium difficile* (5.4%), *Enterobacter spp.* (4.2%), *Proteus spp.* (3.8%) ed *Acinetobacter spp.*(3.6%) [3]. Una questione molto controversa e dibattuta riguarda il ruolo dell'ambiente nel processo di contaminazione del paziente, sia in termini qualitativi che quantitativi, in particolare per quanto riguarda le superfici di confinamento e gli arredi. E' ben noto il fatto che tali superfici rappresentano un serbatoio per i microorganismi e che possono contribuire alla trasmissione dei patogeni ospedalieri, aumentando il rischio di contaminazione mediante contatto diretto con il paziente [8–10]. Per ridurre questi rischi, vengono applicate procedure di sanificazione ad ogni superficie che possa direttamente od indirettamente venire a contatto con la gente. Nonostante prove sperimentali suggeriscano l'impiego di un ragionevole uso di disinfettanti, il loro uso abituale è comunque controverso [11,12]. Ciononostante, una appropriata disinfezione delle superfici è raccomandata da tutte le linee guida internazionali come importante procedura di prevenzione delle infezioni [13–17], ed esistono considerevoli evidenze sui benefici che la pulizia in ospedale possa avere nei confronti della riduzione del numero di ICA [18]. In effetti, il fatto di non poter garantire una corretta pulizia, disinfezione e sterilizzazione può portare alla trasmissione di patogeni da paziente a paziente [19]. D'altro canto, l'uso diffuso di disinfettanti chimici rappresenta un rischio per l'ambiente e per la sicurezza del personale. È chiaro che i microrganismi possono adattarsi ad una varietà di condizioni ambientali sia chimiche che fisiche ed è perciò nient'affatto sorprendente che sia stato segnalato l'insorgere di resistenza ad antisettici e disinfettanti derivata

dal loro impiego prolungato [20,21]. Per queste ragioni, l'importanza di procedure di pulizia che siano mirate al controllo della carica batterica patogena indica la necessità di introdurre strategie innovative e sostenibile.

Un approccio molto promettente, come suggerito da Falagas & Makris nel 2009, consiste nell'uso di microrganismi non patogeni, chiamati probiotici, e definiti come microrganismi viventi capaci di conferire un beneficio in termini di salute nell'ospite e di colonizzare le superfici rigide per contrastare la proliferazione di altre specie batteriche [22], in accordo con il principio di esclusione competitiva (legge di Gause) [23–25]. Questo concetto è stato definito una forma di controllo biologico quando esercitato in antagonismo verso determinati patogeni [26], ed è già stato applicato con successo nell'abbattimento della *Legionella* negli impianti idrici [27]. Diverse indagini hanno confermato che i microrganismi probiotici ed i loro biosurfattanti possono contrastare la crescita dei patogeni nosocomiali sulle superfici [28–32]. Tuttavia, l'attuale impiego di microrganismi di tipo probiotico sulle superfici rigide, come metodo di pulizia, non è ancora stato testato. Pertanto, questo studio valuta l'effetto della pulizia microbica delle superfici rigide negli ospedali, sulla presenza e/o sopravvivenza di microrganismi ICA-correlati sulle superfici trattate. Per avvalorare la significatività statistica dei risultati, lo studio è stato effettuato in tre ospedali indipendenti (uno in Belgio e due in Italia). La comparazione è stata fatta con i protocolli di pulizia chimici e di disinfezione. Questo studio ha come scopo quello di fornire dati sufficienti ad evidenziare che la tecnica di controllo biologico delle superfici ospedaliere può rappresentare un'alternativa sostenibile ai disinfettanti chimici.

Metodi

Test preliminari

Prima della sperimentazione vera e propria in campo negli ospedali, sono stati eseguiti numerosi test presso l'Università di Ghent, l'Università di Ferrara ed l'ospedale AZ di Lokeren, con l'obiettivo di determinare la formulazione più adatta da utilizzare per prodotti pulenti a base microbica. L'identità e la concentrazione dei microrganismi usati nei prodotti pulenti è stata scelta tenendo conto della carica microbiologica media presente sulle superfici rigide, del pH, della temperatura e dell'umidità. I prodotti pulenti microbici utilizzati nelle prove sul campo comprendevano spore di *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*, presenti in una quantità fissa di 5×10^7 CFU/ml di prodotto concentrato. Tutti i prodotti sono stati prodotti da Chrisal (Lommel, Belgio) e forniti ad AZ Lokeren da Chrisal stessa, e da Copma srl. (Ferrara, Italia) ai due ospedali italiani. Per evitare eventuali differenze negli ospedali, dovute ai detergenti impiegati nei prodotti, sono state eseguite diverse prove sul campo nell'ospedale AZ di Lokeren, per confrontare l'effetto fra la versione microbica e non-microbica dei prodotti da usare nei trials ospedalieri (dati non riportati).

Dichiarazione etica

Il protocollo di studio è stato discusso ed approvato dal Comitato Etico Locale. La sperimentazione nei due ospedali siti in Ferrara (Sant'Anna e San Giorgio) sono stati approvati dal Comitato Etico Unico della Provincia di Ferrara dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara (Ferrara, Italia). Per il protocollo di AZ di Lokeren, lo studio è stato approvato da AZ Lokeren Etisch Comité (Comitato Etico di AZ di Lokeren, Lokeren, Belgio). I due comitati etici hanno deliberato che un'autorizzazione formale non era necessaria poiché i prodotti probiotici non sarebbero stati direttamente somministrati ai pazienti ma sfruttati per la sola pulizia delle superfici ospedaliere. Per questa ragione, i Comitati hanno ritenuto non necessaria l'acquisizione di un consenso informato in forma scritta da parte dei partecipanti al trial, vista la natura puramente osservazionale dello studio.

Messa a punto del protocollo di studio ospedaliero

Sono stati eseguiti tre trial ospedalieri indipendenti, in luoghi e tempi differenti. In ciascuno, il confronto è stato fatto fra un metodo di pulizia a base di prodotti microbici ed un metodo di igiene convenzionale (ovvero l'utilizzo di detergenti chimici e disinfettanti). I prodotti pulenti di controllo in AZ Lokeren consistevano in detergenti chimici (Ecolab, Groot-Bijgaarden, Belgio), ed in entrambi gli ospedali italiani sono stati applicati detergenti a base di cloro (Actichlor per tutte le superfici lavabili, Diversey S.p.A., Italia). I prodotti di pulizia microbica in tutti e tre gli ospedali comprendevano: un prodotto di pulizia per pavimenti, un prodotto di pulizia per interni ed un prodotto di pulizia per il bagno (Chrisal, Lommel, Belgio). Il confronto tra il prodotto di controllo ed il prodotto di pulizia microbica è stato effettuato sia nel tempo che tra unità con infrastrutture identiche all'interno dell'ospedale (ad es. due pavimenti del reparto di geriatria presso AZ Lokeren). Ad eccezione dei prodotti, tutti gli altri parametri relativi alle procedure di pulizia (frequenza, equipaggiamento) sono stati i medesimi sia nel controllo che nella pulizia microbica. Le operazioni di pulizia in AZ Lokeren sono state effettuate in linea con il *Probiotic Cleaning Hygiene System* (PCHS) di Copma scr. Il personale addetto alle pulizie non aveva coscienza del fatto che stesse adoperando o meno i prodotti di pulizia microbica.

Descrizione dei reparti ospedalieri

Ospedale Riabilitativo San Giorgio.

L'ospedale San Giorgio (superficie totale 12300 m²) è un centro di riabilitazione da disturbi causati da gravi danni cerebrali. I reparti coinvolti in questo studio sono distribuiti su di un totale di tre piani; ciascun piano (4100 m²) consiste in due reparti identici e speculari, ossia l'Unità Gravi Cerebrolesioni e l'Unità di Medicina Riabilitativa. Questi due reparti sono separati da un corridoio centrale e consistono ciascuno di 22 stanze di degenza (28 m²) fornite di due letti ed un bagno (4,2 m²). In questa struttura, le superfici trattate comprendevano: stanza, corridoio, pavimenti e servizi igienici. In aggiunta, le procedure di pulizia ed i campionamenti sono stati effettuati anche nelle sei palestre utilizzate per la riabilitazione dei pazienti.

Ospedale Universitario Sant'Anna.

I reparti coinvolti nello studio eseguito all'Ospedale Universitario Sant'Anna includevano un reparto di medicina generale, consistente in due identiche aree (Area S ed Area T, ciascuna con una superficie di 550 m²), ed un reparto ambulatoriale comprensivo dei dipartimenti di Oftalmologia/Cardiologia e del dipartimento di Ortopedia (286 m² ciascuno, con camere di 22 m²). Il campionamento microbiologico ha monitorato le camere di degenza (20 in totale, con una superficie di 38 m² ognuna) ed i bagni (10 m²).

Ospedale AZ di Lokeren.

Per quanto riguarda l'Ospedale di Lokeren, nello studio sono state incluse due unità geriatriche strutturalmente identiche (di 500 m² ognuna). I reparti ospitano pazienti anziani, sofferenti di un'ampia varietà di affezioni e stati patologici, inclusi trattamenti chirurgici, cure giornaliere ed alcuni casi di trattamento di infezioni.

Test microbiologici

L'effetto dei prodotti pulenti convenzionali ed a base microbica sui microrganismi ICA-correlati è stato analizzato mediante campionamento delle superfici e test microbiologici su isolati colturali. Sono stati monitorati i seguenti microrganismi correlati ad ICA: *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli* in tutti e tre gli ospedali; *Clostridium spp.* Nell'ospedale AZ di Lokeren; *Candida albicans* all'ospedale Sant'Anna ed all'ospedale San Giorgio. Sono stati raccolti un totale di 20000 campioni

microbiologici (tra le sei e le otto ore dopo la pulizia), durante un periodo di sei settimane per l'ospedale Universitario Sant'Anna, 24 settimane per l'Ospedale AZ di Lokeren e 66 settimane per l'Ospedale San Giorgio, da una grande varietà di superfici quali: pavimenti, porte, davanzali di finestre, sanitari, lavabi, tutte realizzate in pietra, legno, plastica, vetro o metallo. Ogni campionamento superficiale è stato realizzato in triplo, tramite l'uso di piastre a contatto RODAC (*Replicate Organism Detection and Counting*), impiegate per il monitoraggio microbiologico equivalente ad un'area di 24 cm². I terreni di coltura utilizzati sono stati i seguenti: MacConkey Agar (BBL MacConkey Agar, BD) come terreno selettivo e differenziativo per la rilevazione e conta delle *Enterobacteriaceae* (specialmente il gruppo dei batteri coliformi); Baird Parker Agar (Merck Millipore Baird-Parker Agar) come terreno moderatamente selettivo e differenziativo per la conta e la rilevazione degli Stafilococchi coagulasi-positivi, e per la rilevazione dello *Staphylococcus aureus*; Clostridium difficile agar (BBL Clostridium difficile Agar, BD) per la rilevazione selettiva del *Clostridium difficile*; Sabouraud Dextrose Contact Agar addizionato di cloramfenicolo (Merck Millipore) come terreno selettivo per la rilevazione e conta della *Candida albicans*. L'incubazione è stata effettuata in condizioni di aerobiosi a 37 C° (48h – 72h) per il terreno MacConkey, Baird Parker, Cetrimide e Sabouraud Dextrose Contact Agar, ed in anaerobiosi, mediante l'uso di giare anaerobiche (GasPak, BD), a 37 C° (72 h) per il *Clostridium difficile*. Le Unità Formanti Colonie (*Colony Forming Units* - CFU) su tutte le piastre di agar sono state contate manualmente una volta trascorso il rispettivo tempo di incubazione. Occasionalmente, isolati dai suddetti terreni sono stati sottoposti ad identificazione per comprovare la selettività del medium utilizzato. L'identificazione degli isolati è stata eseguita tramite API 20 E (bioMérieux, Inc, Durham, NC, USA), BBL Enterotube II (BD Diagnostic Systems) per *Escherichia coli*, API Staph (bioMeérieux, Inc) per *Staphylococcus aureus*, ed API 20 C Aux (bioMérieux, Inc) per *Candida albicans*.

Antibiogrammi

Il protocollo utilizzato è stato basato sul metodo Kirby-Bauer di suscettibilità agli antimicrobici per diffusione su piastra [33–35], in linea con i criteri stabiliti dall'Istituto di Standardizzazione Clinica e Laboratoriale (*Clinical and Laboratory Standard Institute* - CLSI) [36,37]. In breve, una piastra di 90 mm di terreno Mueller-Hinton agar è stata inoculata con una sospensione di *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), o con ceppi di *Bacillus* isolati, corrispondenti allo standard McFarland di 0.5. Dopo 15 minuti, è stato aggiunto i dischetti di carta (Oxoid Ltd., Thermo Scientific, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) impregnati di una concentrazione nota di composti antimicrobici e la piastra è stata incubata a 37 C° per 24-72 ore. L'interpretazione dei risultati si è basata sui criteri di riferimento CLSI (Tabella S1) [38].

Analisi molecolari

La presenza di geni conferenti resistenza agli antimicrobici negli isolati di *Bacillus* raccolti, è stata valutata tramite metodi di *real time* PCR. Il DNA genomico microbico è stato estratto da ciascun isolato tramite QIAmp UCP Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania), adattando il protocollo per la lisi ottimale dei bacilli Gram positivi e delle spore. Sono stati analizzati due microgrammi di DNA estratto mediante Microbial DNA qPCR Array for Antibiotic Resistance Genes (Qiagen, Hilden, Germania), utilizzando uno strumento Applied Biosystem 7300 e seguendo le istruzioni del costruttore. Le analisi sono state eseguite sui ceppi originariamente presenti nei prodotti pulenti e su 20 differenti isolati colturali provenienti dagli ospedali inclusi nello studio. Come controllo negativo e positivo sono stati impiegati, rispettivamente: Microbial DNA-free water (Qiagen) e Microbial DNA Positive Control (Qiagen). DNA proveniente dal ceppo *E. coli* JM101 è stato inoltre usato come

controllo negativo. I test preliminari hanno mostrato che la sensibilità sperimentale era di circa 10 copie per ciascun gene bersaglio.

Statistiche

Le analisi statistiche si sono basate su modelli lineari generalizzati per misure ripetute. Questo metodo combina le misure ripetute di un modello marginale con il modello generalizzato lineare che segue la distribuzione di Poisson ed il logaritmo come funzione di collegamento. I confronti fra i valori basali e di *follow up* sono stati eseguiti utilizzando le Statistiche di Wald con la correzione di Sidak per comparazioni multiple. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS v 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY; USA).

Risultati

Prima dei trial ospedalieri, sono state condotte numerose sperimentazioni *in vitro* e prove sul campo in piccola scala, al fine di poter determinare sia il miglior protocollo sperimentale che la miglior formulazione dei prodotti da utilizzare nello studio vero e proprio, oltre che per fornire informazioni rilevanti ai comitati etici. Nello studio, l'attenzione è stata posta sulla conta microbiologica e non sulla mera valutazione della rimozione dello sporco. In questi test, i *Bacillus* hanno mostrato un'azione microbiologica molto più efficace rispetto ad altri generi (come *Lactobacillus* e *Pseudomonas*), soprattutto grazie alla capacità di sporulazione (dati non mostrati). La concentrazione ottimale di spore di *Bacillus* da utilizzare è stata determinata in base al valore medio di conta su diversi tipi di superfici rigide negli ospedali. Prima di iniziare le sperimentazioni in ospedale, si è stabilito che la quantità di prodotto batterico da applicare sulle superfici avrebbe dovuto corrispondere alla quantità totale media dei microrganismi contati, rilevata prima dell'applicazione del prodotto pulente microbico. Infine, numerosi test di laboratorio hanno dimostrato che la stessa formulazione di prodotto con e senza l'aggiunta di spore di *Bacillus*, produce effetti significativamente differenti relativi alla carica patogena presente sulle superfici trattate.

Lo studio è stato condotto in tre differenti ospedali e sono stati raccolti circa 20000 campioni. Le analisi microbiche sono state focalizzate su *Staphylococcus aureus*, batteri coliformi, *Clostridium difficile* e *Candida albicans*, in quanto specie rappresentative di microrganismi correlati ad ICA ed indicatori di una adeguata igiene. Per consentire una corretta comparazione fra le diverse strutture ospedaliere, i risultati sono presentati come valori rapportati ai controlli, intesi come valore di contaminazione microbica delle superfici (conte CFU) presente all'inizio della sperimentazione (settimana 0), come mostrato nelle Tabelle S2, S3, S4, S5.

Degno di nota il fatto che l'effetto del prodotto microbico sui differenti patogeni correlati ad ICA si sia mostrato tendenzialmente simile in tutti e tre gli ospedali investigati. Nell'Ospedale Universitario Sant'Anna, il campionamento microbiologico è durato sei settimane, mentre gli altri due ospedali sono stati monitorati rispettivamente fino alla settimana 24 (AZ di Lokeren) e sino alla 66 (Ospedale San Giorgio). Tuttavia, poiché non sono state osservate differenze significative tra le conte microbiche della settimana 24 e 66 della sperimentazione all'Ospedale San Giorgio, i dati presentati si limitano alla settimana 24. Inoltre, durante la sperimentazione è stata anche valutata la conta microbica totale, e non sono stati osservati cambiamenti significativi durante l'intero periodo (dati non mostrati).

Coliformi ed *E. coli*

La Figura 1 mostra i dati medi relativi alla carica batterica di coliformi, utilizzata come indicatore generale del livello di igiene. I valori di riferimento per i coliformi, misurati alla settimana 0, con *E. coli* che rappresenta quasi la metà del totale, sono riportati nella Tabella S2. La conta sulle singole superfici ha mostrato di variare sensibilmente, specialmente in aree specifiche come servizi igienici e

reparti geriatrici. In goni caso, l’inizio dell’impiego della pulizia microbica è risultato in una veloce riduzione della conta dei coliformi e di *E. coli*, raggiungendo un effetto massimo approssimativamente dopo due settimane di pulizia giornaliera. Nel tempo, la riduzione media è stata del 74±21% per i coliformi e del 89±18% per *E. coli*. La riduzione osservata era statisticamente significativa per tutti gli ospedali monitorati.

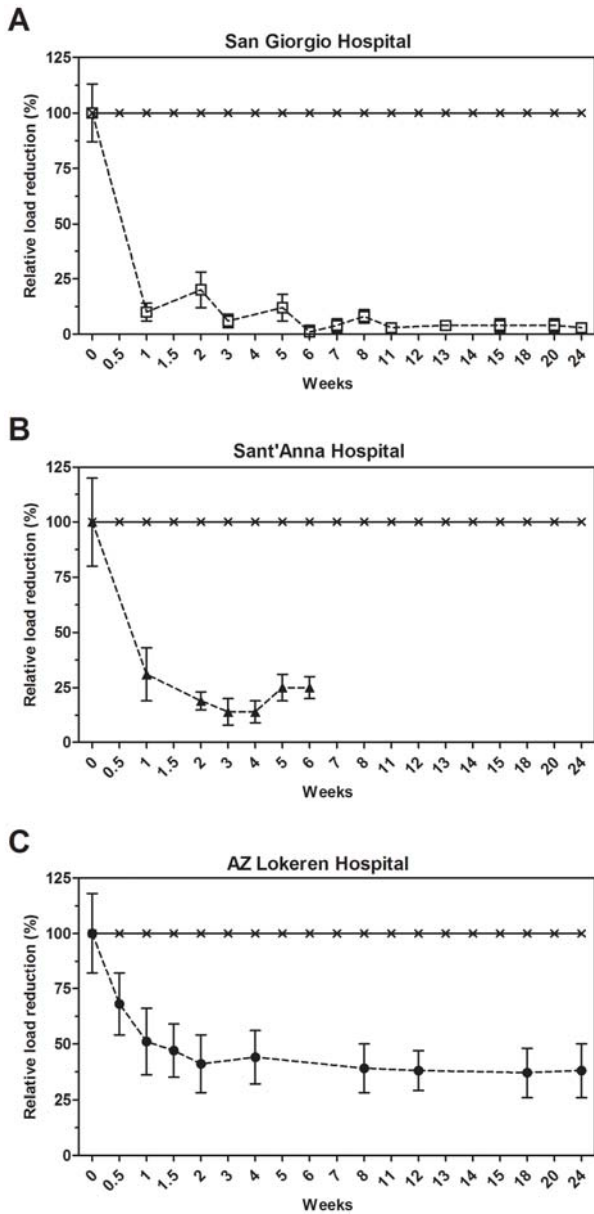


Figura 1. Effetto della pulizia microbica sulla conta dei coliformi sulle superfici. Conta dei coliformi sulle superfici degli Ospedali San Giorgio (A), Sant’Anna (B) ed AZ di Lokeren (C). I risultati sono riportati come percentuale di riduzione relativa comparata al controllo, pulito con prodotti detergenti convenzionali (disinfettanti). Il controllo è rappresentato dal valore di contaminazione microbica superficiale (conta delle CFU) all’inizio dei trial (settimana 0), tale conta di CFU è stata posta come 100% per ottenere confronti affidabili tra i tre Ospedali strutturalmente differenti. Le analisi indicano che i risultati sono statisticamente significativi

S. aureus

I livelli medi di *S. aureus* sulle superfici testate e la corrispondente percentuale di riduzione nel tempo sono riportate rispettivamente nella Tabella S3 e nella Figura 2. Per chiarezza: non sono state fatte distinzioni tra *S. aureus* antibiotico-resistenti ed antibiotico-sensibili. Dopo dieci giorni di pulizia microbica eseguita all’Ospedale San Giorgio, la conta di *S. aureus* sulle superfici, è calata mediamente del 58±12% e del 78±15% in sei settimane, con una riduzione altamente significativa in tutti e tre gli

ospedali (Tabella S3). Le CFU di *S. aureus* sulle superfici trattate si sono dimostrata stabile, con poche eccezioni, durante tutto lo studio (dati non mostrati), sia con la pulizia tradizionale che con quella microbica, suggerendo che quest'organismo non è particolarmente suscettibile alle differenti condizioni ambientali presenti in un ospedale e potrebbe, perciò, sopravvivere in condizioni comuni.

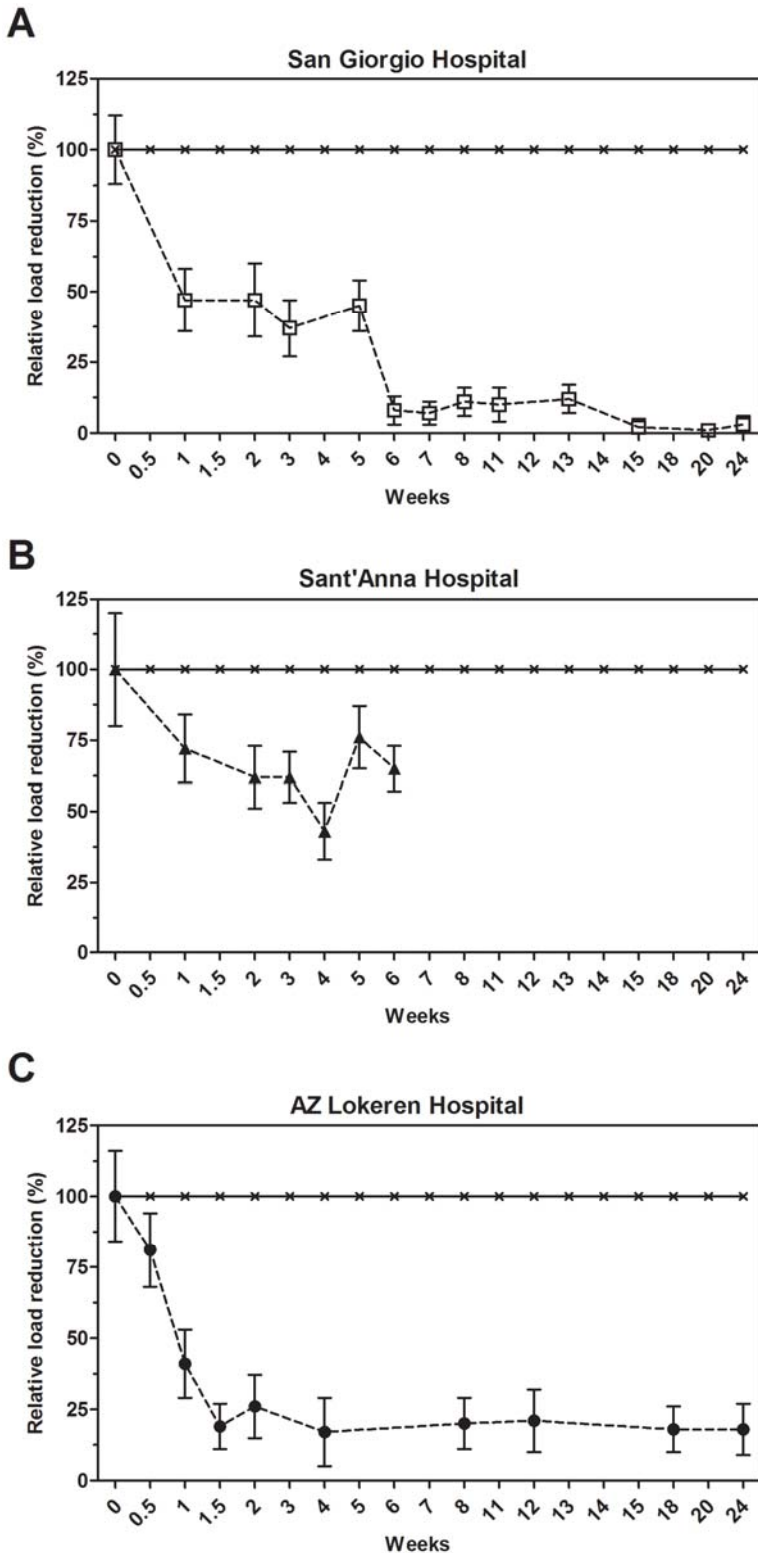


Figura 2. Effetto della pulizia microbica sulla conta di *S. aureus* sulle superfici. Conta di *S. aureus* sulle superfici degli Ospedali San Giorgio (A), Sant'Anna (B) ed AZ di Lokeren (C).I risultati sono riportati come percentuale di riduzione relativa comparata al controllo, pulito con prodotti detergenti convenzionali (disinfettanti). Le analisi indicano che i risultati sono statisticamente significativi.

C. difficile

Un microrganismo ICA-associato meno abbondante ma comunque comune è il *Clostridium difficile*, con una conta media di 500 CFU/m² (Tabella S4), vicino al limite di rilevamento dei protocolli sperimentali utilizzati. Tale microrganismo è stato monitorato con regolarità solo nell’ospedale AZ di Lokeren. Il *C. difficile* ha presentato una variabilità molto elevata di conta specifica su differenti superfici ed in diversi tempi, e ciò, insieme ad una minore conta media generale, ha dato come risultato una maggior deviazione standard, rendendo appena significativo l’effetto della pulizia microbica in paragone con il controllo. La riduzione della carica di *C. difficile* è stata raggiunta molto rapidamente dopo tre giorni di pulizia microbica, con un decremento del 55±47% rispetto ai controlli (Figura 3). Le successive misurazioni, proseguite in modo continuo per 24 settimane, hanno indicato che sulle superfici trattate con pulente microbico i livelli di *C. difficile* sono calati sino a scendere al di sotto dei limiti di rilevabilità del metodo di analisi. La riduzione osservata è risultata significativa alla settimana 4 (p = 0,048), alla 12 (p = 0,007) e particolarmente alla 18 (p = 0,0005) e 24 (p = 0,004), indicando un effetto a lungo termine sulla riduzione della carica di *C. difficile*.

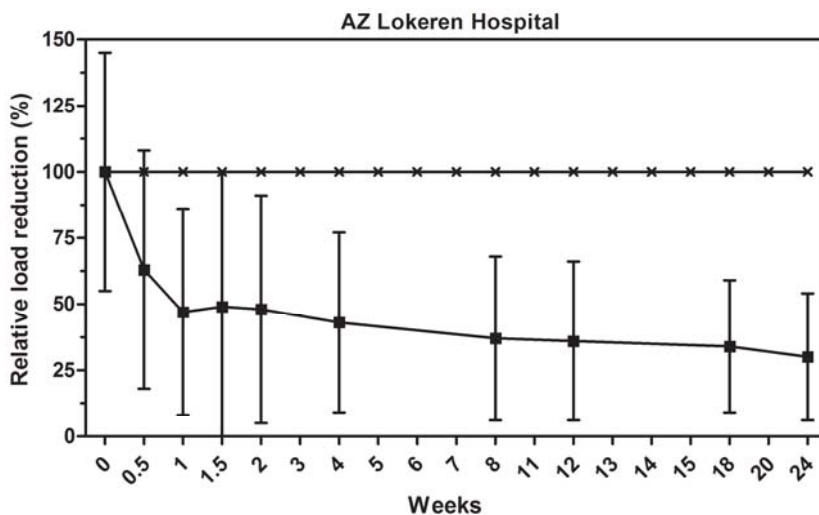
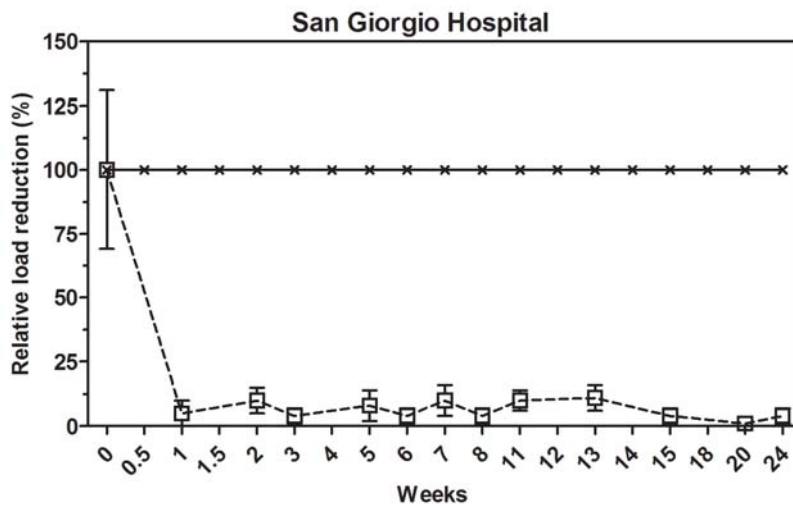


Figura 3. Effetto della pulizia microbica sulla conta di *C. difficile* sulle superfici. Conta di *C. difficile* sulle superfici degli Ospedali San Giorgio (A), Sant’Anna (B) ed AZ di Lokeren (C). I risultati sono riportati come percentuale di riduzione relativa comparata al controllo, pulito con prodotti pulenti convenzionali (disinfettanti). Le analisi indicano che i risultati sono statisticamente significativi

C. albicans

La carica di *Candida albicans* è stata misurata regolarmente nei due ospedali italiani. La Figura 4 mostra i valori medi relativi alla riduzione della stessa. I valori medi di controllo relativi a *C. albicans* sono riportati in Tabella S5. La pulizia microbica ha indotto una rapida riduzione della carica, corrispondente all’82±19% dopo una settimana; da notare che la riduzione della carica di *Candida albicans* si è poi mantenuta stabile nelle settimane successive. Già nella settimana 2, la conta di *Candida albicans* sulle superfici pulite con prodotti microbici, risultava al di sotto dei limiti di rilevamento dei protocolli sperimentali. In effetti, la riduzione osservata è stata altamente significativa in entrambi gli ospedali (Tabella S5).

A



B

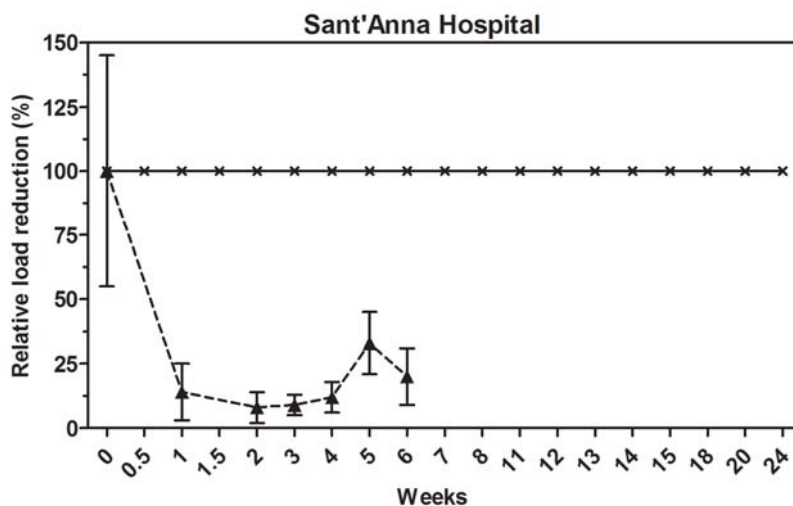


Figura 4. Effetto della pulizia microbica sulla conta di *C. Albicans* sulle superfici. Conta di *C. albicans* sulle superfici degli Ospedali San Giorgio (A), Sant'Anna (B) ed AZ Lokeren (C).I risultati sono riportati come percentuale di riduzione relativa comparata al controllo, pulito con prodotti detergenti convenzionali (disinfettanti). Le analisi indicano che i risultati sono statisticamente significativi.

Time trial con prodotti tradizionali e microbici

Nei reparti geriatrici dell'Ospedale AZ di Lokeren è stato condotto un esperimento separato, applicando le procedure di pulizia tradizionale e microbica in modo alternato e monitorando la carica batterica per 10 settimane. Il prodotto microbico (dalla settimana 0 alla settimana 2) è stato applicato dopo due settimane di pulizia convenzionale (dalla settimana -2 alla settimana 0), e quest'ultima è poi stata reintrodotta per un secondo periodo di 8 settimane (dalla settimana 2 alla 10). In accordo con le precedenti osservazioni, il prodotto microbico ha ridotto sensibilmente sia la carica dei coliformi che quella di *S. aureus*, con conte diminuite, rispettivamente, da 9250 ± 1750 CFU/m² a 3200 ± 1200 CFU/m² e da 4200 ± 1200 CFU/m² a 950 ± 450 CFU/m² dopo 2 settimane. Al contrario, quando il metodo microbico è stato rimpiazzato dalle procedure convenzionali, entrambe le cariche sono aumentate fino a livelli comparabili a quelli osservati prima dell'applicazione dei probiotici (periodo fra la settimana -2 e la settimana 0) (Figura 5). L'applicazione dei prodotti microbici ha portato ad un decremento significativo della carica dei coliformi ($p=0,0001$, dalla settimana 0,5 alla 3) e di *S. aureus* ($p=0,003$, dalla settimana 1 alla 3), confrontato con il valore misurato alla settimana 0, mentre invece non sono state osservate differenze significative dopo la sostituzione della pulizia microbica con quella convenzionale. Nel complesso, i dati sulla pulizia microbica hanno indicato che

la forte riduzione della carica patogena è rimasta stabile nel tempo e che gli effetti osservati erano direttamente correlati alla sua applicazione, come indicato dal confronto con il sistema di pulizia tradizionale.

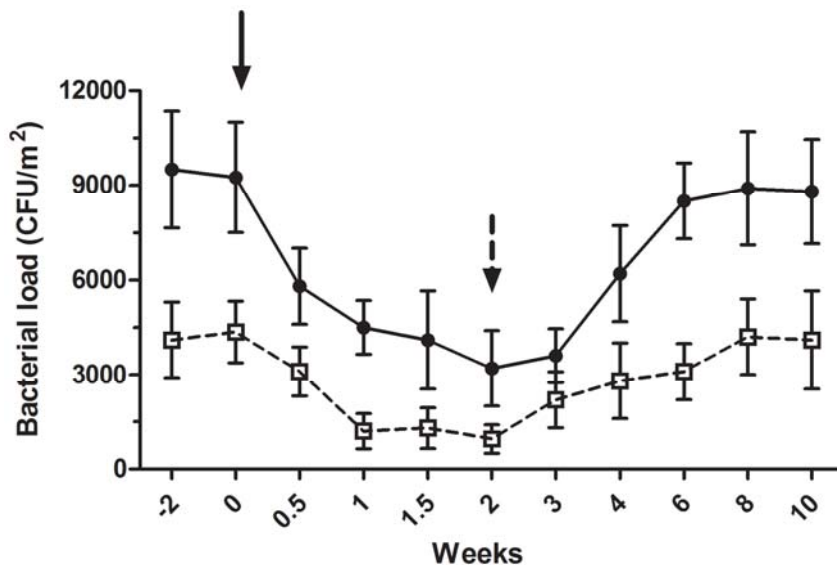


Figura 5. Effetto del passaggio del tempo sulla conta superficiale di coliformi e *S.aureus*. Il time-trial dei coliformi (cerchi neri) e *S. aureus* (quadrati bianchi) è stato realizzato nel dipartimento di Geriatria dell'Ospedale AZ di Lokeren. La conta sulle superfici, indicata come CFU/m², è stata rilevata dopo l'applicazione di prodotti convenzionali (dalla settimana -2 alla 0) e microbici (dalla settimana 0 alla 2), seguita da un successivo periodo di pulizia tradizionale (dalla settimana 2 alla 10). L'applicazione di prodotti a base di probiotici ha portato ad un calo significativo della carica dei coliformi ($p=0,0001$) e di *S. aureus* ($p=0,003$). Freccia lineare: inizio del sistema di pulizia microbico. Freccia tratteggiata: pulizia convenzionale.

Suscettibilità/resistenza agli antibiotici degli isolati di *Bacillus*

Per monitorare la comparsa di resistenze ai farmaci antimicrobici nei ceppi di *Bacillus*, abbiamo eseguito sia antibiogrammi tradizionali che analisi molecolari su isolati di *Bacillus* raccolti dalle superfici trattate. I risultati preliminari degli antibiogrammi, sia sui *Bacillus* derivati sia dal PCHS che da isolati, hanno mostrato la già nota naturale resistenza alla penicillina. Il profilo di suscettibilità per gli altri antibiotici testati (cefoperazone, cefalotina e gentamicina) era comparabile a quello del ceppo ATCC di riferimento, con la sola eccezione della clindamicina, per la quale sono stati osservati valori intermedi (Tabella 1). Per aumentare il numero di fattori di resistenza antimicrobica analizzati, 20 isolati di *Bacillus*, raccolti da 6 a 12 mesi dopo l'inizio della sperimentazione ospedaliera, sono stati anche analizzati mediante un saggio di qPCR capace di rilevare 87 geni associati a resistenza agli antibiotici. Prima di testare gli isolati di *Bacillus*, il metodo è stato messo a punto su campioni di DNA di *Bacillus spp.*, dimostrando che questa tecnica può essere utilizzata come affidabile strumento per le successive analisi. Le analisi sui prodotti a base di probiotici hanno rivelato l'esistenza di geni di resistenza costitutivi delle specie di *Bacillus* contenuti nella formulazione originale, confermando precedenti dati presenti in letteratura (Figura 6). Da notare il fatto che nessun *Bacillus* isolato dal campo ha mostrato di possedere geni di resistenza nuovi od acquisiti, indicando che tale batterio non va incontro a fenomeni mutagenici o ad eventi di trasferimento genico, anche dopo 12 mesi dall'inizio dell'applicazione, confermando i risultati osservati negli antibiogrammi.

Tabella 1. Antibiogrammi su *Bacillus spp.* da prodotti detergenti e da isolati.

	Zone Diameter Interpretive Criteria (mm)				
	Beta-lactams			Aminoglycosides	Lincosamides
	Penicillin	Cefoperazone	Cefalotin	Gentamicin	Clindamycin
	(10 U)	(30 µg)	(30 µg)	(10 µg)	(2 µg)
ATCC 6633	7 R ^a	20 I ^b	30 S	25 S	25 S
PCHS product	14 R	19 I	24 S	24 S	18 I
<i>Bacillus spp.</i> isolate 1	12 R	19 I	20 S	25 S	20 I
<i>Bacillus spp.</i> isolate 2	15 R	20 I	30 S	25 S	16 I
<i>Bacillus spp.</i> isolate 3	10 R	30 S ^c	35 S	30 S	25 S

^aResistant.

^bIntermediate.

^cSusceptible.

Note: for reference criteria see Table S1.

Antibiograms were conducted on *Bacilli* from the PCHS products and isolates, with ATCC 6633 strain as reference. Results are reported as diameter (expressed in mm) of the zones of inhibition and the corresponding interpretive criteria, in accordance to the CLSI reference criteria [38] (Table S1).

doi:10.1371/journal.pone.0108598.t001

^a Resistente. ^b Intermedio. ^c Sensibile. Gli antibiogrammi sono stati eseguiti su *Bacilli* provenienti dai prodotti PCHS e da isolati, con il ceppo ATCC 6633 come riferimento. I risultati sono riportati come diametro (espresso in mm) delle zone di inibizione ed i corrispettivi criteri di interpretazione, in accordo con i riferimenti CLSI [38]

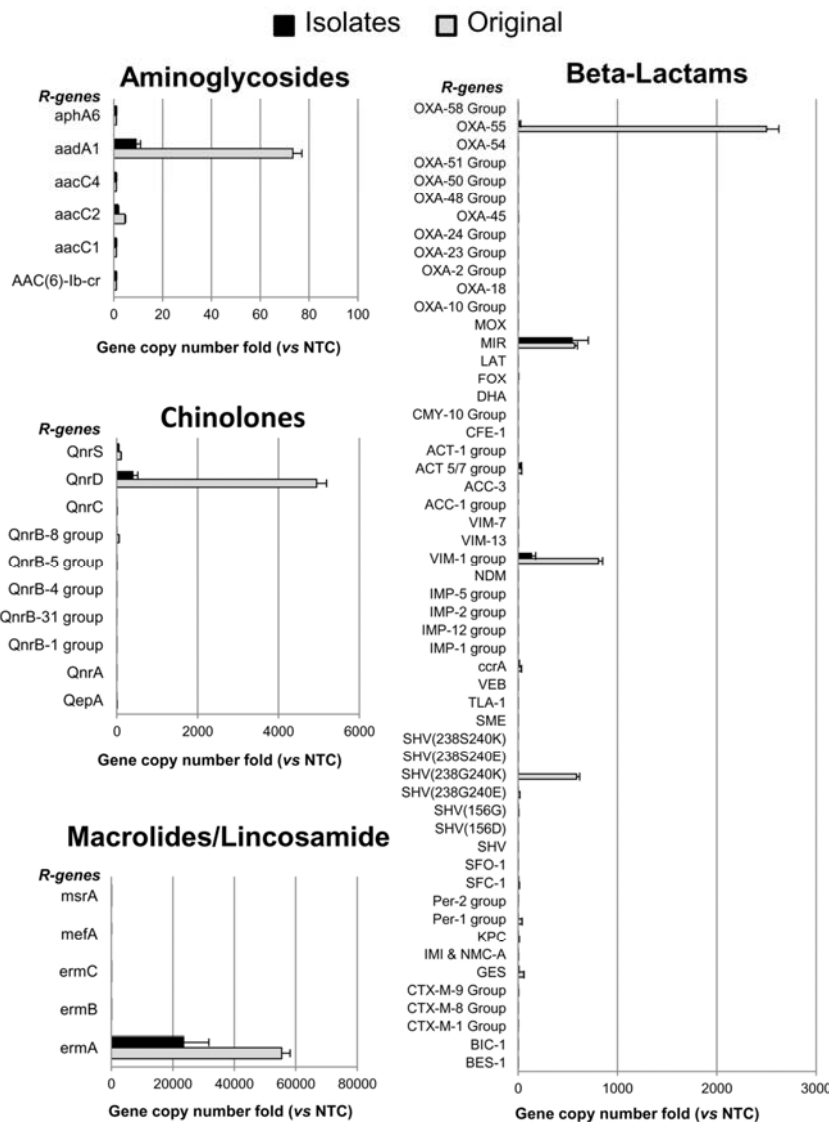


Figura 6. Profilo genico di resistenza agli antimicrobici mediante saggio di qPCR. Il DNA di *Bacillus spp.* proveniente dai prodotti detergenti (Original) e da 20 colonie di *Bacillus spp.* isolate dalle superfici trattate fino a 12 mesi dopo l'inizio del protocollo di pulizia (Isolates), è stato analizzato attraverso qPCR Microarray per rilevare la presenza di geni conferenti resistenza agli antibiotici (R genes).

Dna del ceppo di *E. coli* JM101 è stato impiegato come controllo negativo (NTC). I risultati sono riportati in termini di numero di copie di geni, confrontando i valori rilevati con quelli ottenuti nel DNA di controllo negativo, entrambi normalizzati per numero di cellule batteriche. Quei geni codificanti per resistenze ad antibiotici non inclusi nella figura (es. vancomicina, tetracicline) hanno dato risultato negativo sia nelle librerie "Original" che "Isolates". I risultati sono riportati come media \pm deviazione standard.

Discussione

Dati gli ultimi report ufficiali riguardanti la diffusione delle ICA [3], e l'evoluzione delle resistenze microbiche agli antibiotici e ai disinfettanti [20, 39], appare chiaro come lo sviluppo di strategie innovative e sostenibili, per affrontare il problema della contaminazione delle superfici ospedaliere, sia di grande interesse. Oltre alla trasmissione di patogeni da persona a persona, le superfici ambientali contaminate costituiscono una fonte importante di potenziale trasmissione di svariati patogeni correlati all'assistenza sanitaria, proprio per la loro capacità di persistere su tali superfici inanimate [9,10,40]. Ciò sottolinea l'importanza di procedure di pulizia mirate al controllo della carica batterica patogena persistente sulle superfici ospedaliere e, conseguentemente, al controllo delle ICA, come indicato dalle numerose evidenze di una correlazione tra pulizia dell'ambiente ospedaliero e riduzione delle ICA stesse [18]. Questo studio sviluppa l'ipotesi proposta da Falagas & Makris [22], riguardante l'utilizzo di probiotici come parte integrante delle procedure di pulizia quotidiane per abbassare l'incidenza di microrganismi correlati ad ICA nelle strutture sanitarie. Prove dell'efficacia dei probiotici per la prevenzione ed il trattamento delle infezioni sono state raccolte sia *in vitro* che *in vivo* [41–43]. Esiste una grande varietà di microrganismi correlati ad ICA e, in questo studio, la scelta dei microrganismi da monitorare è stata per lo più dettata dalla rilevanza e dalla relativa abbondanza di microrganismi presenti negli ospedali partecipanti. I coliformi sono stati scelti come indicatore del livello generale di igiene e di pulizia. Sebbene alcune ICA siano associate ad epidemie ed altre mostrino una presenza piuttosto costante, i microrganismi a loro correlati vengono sempre rilevati in qualunque momento sulle superfici rigide, come questo studio dimostra. Ciò implica che le superfici fungono da serbatoio capace di iniziare un'epidemia nel momento in cui le persone vengono contaminate e cominciano a diffondere patogeni ad altre. Lo scopo di questo studio è stato quello di raccogliere un elevato numero di dati provenienti da strutture sanitarie diverse ed indipendenti, ed i 20000 campioni microbici raccolti dalle superfici contribuiscono a conferire significatività ai risultati. Tuttavia, il grande numero di analisi rende impossibile presentare ogni specifico dato ed ogni singola osservazione effettuata in questo studio. Pertanto, data la sostanziale riproducibilità delle conte medie rilevate nei diversi ospedali, i dati sono stati presentati come confronto della contaminazione tra superfici trattate con pulizia convenzionale o microbica. Generalmente è stato osservato che la pulizia microbica delle superfici rigide ha portato, in due settimane, ad un chiaro cambiamento dell'assetto microbiologico. Con l'eccezione di *Clostridium difficile*, è stata rilevata una diminuzione significativa dei microrganismi correlati ad ICA, rispetto a ciò che si osserva con metodi di pulizia e disinfezione convenzionali. Dopo due settimane di pulizia microbica, la riduzione di microrganismi correlati ad ICA è rimasta costante e spesso al di sotto del limite di rilevabilità del protocollo sperimentale. La deviazione standard di alcuni valori si è rivelata alta (probabilmente per la grande differenza intercorrente tra i tipi di superficie testati), ma in ogni caso tale differenza è risultata ampiamente significativa, a dimostrazione dell'effetto esercitato dalla pulizia microbica paragonata al controllo. I nostri risultati indicano che la pulizia microbica ha chiaramente diminuito la presenza di microrganismi associati ad ICA sulle superfici rigide, rispetto alle procedure di pulizia convenzionali, senza invece abbassare in modo significativo la conta microbica totale. Inoltre, i dati mostrano che quando il metodo di pulizia microbica viene sostituito da procedure convenzionali, il numero dei microrganismi correlati ad ICA aumenta nuovamente fino a raggiungere i valori iniziali (più alti) osservati prima dell'inizio dell'applicazione dei probiotici. Queste osservazioni indicano che il metodo di pulizia a base di probiotici ha un effetto, sul numero dei microrganismi correlati ad ICA, limitato nel tempo e che tale metodo necessita di essere continuamente e regolarmente applicato per poter

mantenere l'effetto riduttivo descritto. La pulizia microbica quindi ha dato come risultato una sostituzione parziale e non permanente dei patogeni ICA-associati con i ceppi di *Bacillus* presenti nei detergenti probiotici. Benché questo studio non mirasse ad investigare il preciso meccanismo alla base dei cambiamenti osservati nel microbiota superficiale, si possono comunque fare supposizioni basandosi sulla letteratura esistente. Il meccanismo più rilevante alla base dell'effetto osservato è molto probabilmente dovuto alla competizione esclusiva: ceppi di *Bacillus* presenti nella soluzione pulente, applicati alle superfici, possono competere, in termini di nutrienti e di spazio, con il microbiota già presente [44]. Woo & Ahn hanno suggerito che l'esclusione competitiva può persino destabilizzare certi biofilm [44], il che è stato osservato nel presente studio sotto forma di sedimento che poteva essere rimosso dalle superfici dopo diverse settimane di pulizia microbica. Tale fenomeno di rimozione del biofilm dalle superfici rigide per l'applicazione di metodi di pulizia microbica meriterebbe ulteriori indagini. Un altro meccanismo che probabilmente contribuisce a cambiare il microbiota superficiale a seguito di pulizia microbica, e destabilizza anche la formazione del biofilm, è quello del *quorum sensing* e *quorum quenching* [45]. La costante introduzione artificiale di elevati numeri di *Bacillus spp.* mediante i prodotti pulenti, potrebbe destabilizzare le dinamiche di popolazione microbica sulle superfici e nel biofilm (Es. il sedimento). Dato l'effetto generale della pulizia microbica, osservato su diversi microrganismi ICA-associati, è probabile che i più importanti meccanismi coinvolti consistano in effetti non selettivi, come l'esclusione competitiva ed il *quorum sensing*. Oltre a questi meccanismi generali, altre interazioni più specifiche potrebbero contribuire all'effetto di riduzione su uno o più microrganismi correlati ad ICA. Per esempio, la produzione di batteriocine, oppure l'effetto di alcuni enzimi prodotti da *Bacillus spp* [46], potrebbero influenzare altri organismi in modo più mirato. Riguardo al *Clostridium*, è stato suggerito che gli enzimi corticalici coinvolti nella germinazione delle spore di *Bacillus* [47] nei prodotti di pulizia microbica potrebbero innescare anche la germinazione delle spore di *Clostridium* sulle superfici. Le cellule di *Clostridium* germinate potrebbero venire successivamente uccise dall'ossigeno o potrebbero subire esclusione competitiva. Qualunque sia il vero e proprio meccanismo coinvolto, questo studio dimostra che la pulizia microbica nelle strutture sanitarie è capace di diminuire in modo significativo le conte superficiali di svariati microrganismi correlati ad ICA. La questione più importante riguarda la sicurezza nell'applicare il metodo di pulizia microbica come sistema di biocontrollo nelle strutture sanitarie. Ovviamente, l'identificazione e la sicurezza dei ceppi batterici utilizzati nei prodotti è di grandissima importanza, così come i processi coinvolti nell'intera sequenza produttiva. I ceppi utilizzati in questo studio (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*), sono organismi probiotici, per i quali esistono dati dettagliati, forniti dal produttore, per quanto riguarda sicurezza e tossicità, oltre ad essere noti come non pericolosi per l'uomo [48–51]. In aggiunta, tutti i processi di produzione e di controllo qualitativo sono certificati in base alla norma ISO9001:2008. Ancora, l'utilizzo di probiotici per diverse applicazioni biotecnologiche e biofarmaceutiche, come indicato dal recente impiego di *B. subtilis* come agente di biocontrollo in acquacoltura [52], agricoltura [53–55], come adiuvante [56, 57] o, in forma di spora, come *delivery system* per lo sviluppo di nuovi vaccini [58–63], è stato oggetto di studio e di controllo. In ogni caso, è chiaro che la sola pulizia microbica non potrà risolvere il problema emergente delle ICA. Ci sono forti evidenze che indicano come un corretto programma di igiene delle mani in ambito ospedaliero rappresenti un utile strumento di riduzione delle ICA [64,65]. Pertanto, la pulizia microbica dovrebbe divenire parte di un protocollo di igiene complessivo, così come il sistema di pulizia microbica impiegato in questo studio (PCHS). Questo protocollo sottolinea come in specifiche aree o per specifici eventi sia richiesta una corretta disinfezione piuttosto che l'impiego di procedure di pulizia microbica, così come fornisce istruzioni per una corretta igiene delle mani o per l'isolamento delle persone contaminate. Inoltre, epidemie sporadiche, come le infezioni virali, potrebbero richiedere misure eccezionali che non seguano le normali procedure di pulizia e disinfezione. Nonostante l'effetto di riduzione di diversi microrganismi

correlati ad ICA, i prodotti di pulizia microbica non devono essere usati come disinfettanti né devono essere considerati tali. Infatti, quando una superficie è costantemente contaminata, deve essere disinfettata, in particolare se localizzata in un'area ad alto rischio. La pulizia con prodotti a base di probiotici può superare i limiti d'azione dei disinfettanti tradizionali, diminuendo la persistenza dei patogeni sulle superfici e rimuovendo il biofilm, che può fungere da rifugio per altri patogeni. I prodotti a base di probiotici usati in questo studio sono adatti alla sola pulizia, sottolineando che, qualora la disinfezione si renda necessaria, si deve usare un disinfettante; tuttavia la combinazione con un protocollo di pulizia a base di probiotici permetterà il mantenimento, a lungo termine, di un basso livello di contaminazione.

Per valutare la suscettibilità o la resistenza agli antibiotici dei ceppi di *Bacillus*, abbiamo implementato la nostra ricerca mediante l'impiego di antibiogrammi, che sono stati eseguiti su colonie di *Bacillus spp.* provenienti dagli stessi campioni prelevati sulle superfici (Es. pavimenti) monitorate in ambito ospedaliero. I primi risultati indicano che i ceppi isolati di *Bacillus spp.* sono suscettibili agli antibiotici testati, con l'eccezione di quelli ai quali *Bacillus spp.* è naturalmente resistente, così come indicato dagli antibiogrammi compiuti su ceppi ATCC standard. Siamo consapevoli del fatto che lo studio è stato focalizzato su un numero limitato di microrganismi e che le tecniche basate sull'impiego di colture presentano delle limitazioni, dovute al fatto che singole colonie potrebbero non essere rappresentative dell'intero genere batterico analizzato. Per quanto riguarda l'aspetto della sicurezza, per aumentare la rappresentatività dei risultati, 20 isolati di *Bacillus* sono stati testati anche mediante qPCR, una metodica progettata per saggiare simultaneamente la presenza di 87 differenti geni di resistenza. Oltre all'alto numero di fattori di resistenza analizzati, questo metodo ha il vantaggio di un'alta sensibilità, che permette la rilevazione di poche copie del gene bersaglio, permettendo così l'identificazione di geni di resistenza agli antimicrobici anche quando nel campione fosse presente un bassissimo numero di cellule batteriche positive a tali resistenze. L'affidabilità di questo saggio per l'analisi di ceppi di *Bacillus* è supportata, come atteso, dalla rilevazione di quei geni di resistenza noti per essere presenti nei *Bacillus spp.* contenuti nella formulazione dei prodotti pulenti utilizzati [66]. Benché questi saggi siano stati eseguiti su soli 20 isolati di *Bacillus spp.*, tali risultati preliminari non mostrano l'acquisizione di nuovi geni di resistenza, anche in un periodo di 12 mesi, rafforzando l'ipotesi che l'uso di spore di *Bacillus* in prodotti pulenti possa essere considerato sicuro per la salute. In parallelo, i risultati ottenuti mostrano che questa metodologia può essere utilizzata per la valutazione di fattori di resistenza antimicrobica in *Bacillus* e indicano questo saggio come un'importante implementazione per studi futuri riguardanti la sicurezza.

Conclusioni

Data la recente e veloce evoluzione di patogeni multiresistenti in strutture sanitarie, c'è la necessità di trovare alternative, efficaci ed ecologicamente sostenibili, ai prodotti chimici utilizzati per la pulizia e la disinfezione quotidiana. Questo studio dimostra che la pulizia microbica (basata sull'uso di probiotici) è più efficace, a lungo termine, nell'abbassare il numero di microrganismi correlati ad ICA, se confrontata con prodotti pulenti convenzionali, contenenti composti disinfettanti come i cloroderivati. Le prime indicazioni sulle percentuali di ICA negli ospedali, monitorati su base continua in questo studio, sono molto promettenti e potrebbero aprire la strada ad una nuova ed economica strategia per contrastare o (bio)controllare i patogeni correlati all'assistenza sanitaria. Quando si parla di gestione del rischio, si dovrebbe decidere se il paziente debba soggiornare in un ambiente dominato da organismi probiotici o in uno in cui i livelli di organismi patogeni resistenti si fanno via via sempre più elevati.

Informazioni di supporto

Tabella S1. Criteri di riferimento per l'interpretazione delle zone di inibizione nel test suscettibilità agli antimicrobici per diffusione su piastra.

Zone Diameter Interpretive Criteria (mm)				
Antimicrobial Agent	Disk Content	S	I	R
Penicillin	10 U	≥19		≤28
Cefoperazone	30 µg	≥21	16-20	≤15
Cefalotin	30 µg	≥18	15-17	≤14
Gentamicin	10 µg	≥15	13-14	≤12
Clindamycin	2 µg	≥21	15-20	≤14

La tabella mostra i criteri di interpretazione per la correlazione fra il diametro (espresso in mm) delle zone di inibizione e la relativa interpretazione, riportati come Suscettibile (S), Intermedio (I) e Resistente (R), in accordo con i riferimenti CLSI [38]

Tabella S2. Analisi statistica della riduzione della carica di coliformi.

San Giorgio Hospital					Sant'Anna Hospital					AZ Lokeren				
Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value	Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value	Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value
0	4687	1787-7587			0	3055	2391-3720			0	8853	8278-9428		
1	479	133-825	4208	0.004	1	955	583-1327	2100	0.0005	0.5	6773	6182-7364	2080	0.0005
2	958	161-1755	3729	0.011	2	599	173-1024	2456	0.0005	1	5413	4820-6006	3440	0.0005
3	271	85-457	4416	0.003	3	425	202-648	2630	0.0005	1.5	4240	3795-4685	4613	0.0005
5	583	207-959	4104	0.005	4	217	83-351	2838	0.0005	2	3627	3278-3975	5226	0.0005
6	42	0-90	4645	0.002	5	781	424-1138	2274	0.0005	4	3680	3292-4067	5173	0.0005
7	187	0-401	4500	0.002	6	764	340-1188	2291	0.0005	8	3293	2947-3639	5560	0.0005
8	354	105-603	4333	0.002						12	3507	3163-3850	5346	0.0005
11	125	47-202	4562	0.002						18	3200	2846-3553	5653	0.0005
13	167	63-270	4520	0.002						24	3560	3273-3846	5293	0.0005
15	83	11-155	4604	0.002										
20	146	0-327	4541	0.002										
24	125	37-212	4562	0.002										

I risultati sono espressi in CFU/m².

Tabella S3 Analisi statistica della riduzione della carica di *Staphylococcus aureus*.

San Giorgio Hospital					Sant'Anna Hospital					AZ Lokeren				
Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value	Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value	Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value
0	8958	7270-10646			0	13747	11733-15761			0	5267	4734-5799		
1	4205	2963-5448	4753	0.0005	1	6916	6087-7746	6830	0.0005	0.5	3907	3444-4368	1360	0.0005
2	4258	3029-5487	4700	0.0005	2	5574	4935-6213	8173	0.0005	1	2400	2051-2749	2867	0.0005
3	3333	2513-4153	5625	0.0005	3	6426	5710-7143	7230	0.0005	1.5	1400	1094-1706	3867	0.0005
5	4023	3001-5045	4935	0.0005	4	6215	5462-6968	7532	0.0005	2	1253	950-1556	4014	0.0005
6	768	384-1152	8190	0.0005	5	7811	7144-8477	5936	0.0005	4	1013	760-1267	4254	0.0005
7	586	236-935	8372	0.0005	6	5724	413,9-7309	8023	0.0005	8	920	668-1172	4347	0.0005
8	963	489-1437	7995	0.0005						12	960	757-1162	4307	0.0005
11	911	537-1285	8047	0.0005						18	760	547-97525	4507	0.0005
13	1041	597-1486	7917	0.0005						24	627	395-858	4640	0.0005
15	234	69-399	8724	0.0005										
20	104	0-218	8854	0.0005										
24	286	87-485	8672	0.0005										

I risultati sono espressi in CFU/m².

Tabella S4 Analisi statistica della riduzione della carica di *Clostridium difficile*.

Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value
0	425	331-519		
0.5	375	285-465	50	1
1	267	168-366	158	0.818
1.5	175	98-252	250	0.057
2	183	83-284	242	0.121
4	125	48-202	300	0.048
8	217	102-331	208	0.203
12	142	50-233	283	0.007
18	83	30-136	342	0.0005
24	108	40-177	317	0.004

I risultati sono espressi in CFU/m².

Tabella S5 Analisi statistica della riduzione della carica di *Candida albicans*.

San Giorgio Hospital					Sant'Anna Hospital				
Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value	Weeks	Mean CFU/m ² Count	95% CI	Difference between means	P-value
0	2187	1605-2769			0	15625	7019-24230		
1	104	16-192	2083	0.0005	1	217	56-378	15408	0.0005
2	208	0-439	1979	0.0005	2	269	120-418	15356	0.0005
3	78	0-189	2109	0.0005	3	174	0-347	15451	0.0005
5	182	29-335	2005	0.0005	4	139	25-253	15486	0.0005
6	78	0-170	2109	0.0005	5	1111	798-1424	14514	0.001
7	208	64-353	1979	0.0005	6	729	365-1093	14896	0.001
8	78	0-162	2109	0.0005					
11	208	32-385	1979	0.0005					
13	234	77-391	1953	0.0005					
15	78	2-154	2109	0.0005					
20	26	0-76	2161	0.0005					
24	78	0-162	2109	0.0005					

I risultati sono espressi in CFU/m².

Contributo degli Autori

Concezione e progettazione degli esperimenti: RT PA PGB EC SM. Esecuzione degli esperimenti: AV RT AF EC. Analisi dei dati: SM RT AF EC DP AB. Contributo per reagenti/materiali/strumenti analitici: SM AV AF EC. Redazione dell'articolo: RT AB DP EC SM.

Bibliografia

- Burke JP (2003) Infection control - a problem for patient safety. N Engl J Med 348: 651–656.
- Allegranzi B, Nejad SB, Castillejos GG, Kilpatrick C, Kelley E, et al Clean Careis Safer Care Team (2011) Report on the Burden of Endemic Health Care–Associated Infection Worldwide. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Available: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501507_eng.pdf
- Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Diaz Ho¨gberg L (2013) Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control. Available: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-usepps.pdf>.
- Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Jr., Horan TC, Gaynes RP, et al. (2007) Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. Public Health Rep 122: 160–166.

5. Scott D (2009) The direct medical costs of Healthcare-Associated Infections in U.S. Hospitals and the benefits of prevention. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Available: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott_costpaper.pdf.
6. Davis GS, Sevdalis N, Drumright LN (2014) Spatial and temporal analyses to investigate infectious disease transmission within healthcare settings. *J Hosp Infect* 86: 227–243.
7. Gaudart J, Cloutman-Green E, Guillas S, D’Arcy N, Hartley JC, et al. (2013) Healthcare environments and spatial variability of healthcare associated infection risk: cross-sectional surveys. *PLoS One* 8: e76249.
8. Hota B (2004) Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis* 39: 1182–1189.
9. Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6: 130.
10. Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL (2013) Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control* 41: S6–11.
11. Rutala WA, Weber DJ (2005) The benefits of surface disinfection. *Am J Infect Control* 33: 434–435.
12. Dettenkofer M, Spencer RC (2007) Importance of environmental decontamination— a critical view. *J Hosp Infect* 65 Suppl 2: 55-57.
13. Rutala WA (1996) APIC guideline for selection and use of disinfectants. 1994,1995, and 1996 APIC Guidelines Committee. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. *Am J Infect Control* 24: 313–342.
14. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR (1999) Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20: 250–278.
15. WHO/CDS/CSR/EPH. Prevention of Hospital-acquired infections; a practical guide. Vol. 12, 2002.
16. Sehulster L, Chinn RY, Cdc, Hicpac (2003) Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep* 52: 1–42.
17. Rutala WA, Weber DJ, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008) Guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities. http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/toc.html, Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
18. Dancer SJ (2009) The role of environmental cleaning in the control of hospitalacquired infection. *J Hosp Infect* 73: 378–385.
19. Weber DJ, Rutala WA (2013) Assessing the risk of disease transmission to patients when there is a failure to follow recommended disinfection and sterilization guidelines. *Am J Infect Control* 41: S67–71.
20. McDonnell G, Russell AD (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12: 147–179.

21. Frabetti A, Vandini A, Balboni P, Triolo F, Mazzacane S (2009) Experimental evaluation of the efficacy of sanitation procedures in operating rooms. *Am J Infect Control* 37: 658–664.
22. Falagas ME, Makris GC (2009) Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *J Hosp Infect* 71: 301–306.
23. Gause GF (1932) Experimental studies on the struggle for existence. *J Exp Biol* 9: 389–402.
24. Hardin G (1960) The competitive exclusion principle. *Science* 131: 1292–1297.
25. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 8: 15–25.
26. Gatesoupe FJ (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180:147–165.
27. Temmerman R, Vervaeren H, Nosedá B, Boon N, Verstraete W (2007) Inhibition of *Legionella pneumophila* by *Bacillus* sp. *Eng Life Science* 7: 1–8.
28. Rodrigues L, van der Mei H, Teixeira JA, Oliveira R (2004) Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 306–311.
29. Rodrigues L, van der Mei HC, Teixeira J, Oliveira R (2004) Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Appl Environ Microbiol* 70: 4408–4410.
30. Rodrigues L, van der Mei H, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R (2006) Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 107–112.
31. Rodrigues LR, Banat IM, van der Mei HC, Teixeira JA, Oliveira R (2006) Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *J Appl Microbiol* 100: 470–480.
32. Walencka E, Rozalska S, Sadowska B, Rozalska B (2008) The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol (Praha)* 53: 61–66.
33. Bauer AW, Perry DM, Kirby WM (1959) Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci; an analysis of technique and results. *A M A Arch Intern Med* 104: 208–216.
34. Kirby WM, Yoshihara GM, Sundsted KS, Warren JH (1957) Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiot Annu* 1956– 1957:892–897.
35. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493–496.
36. CLSI M45A (2006) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).
37. CLSI M2-A9 (2009) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. 9th ed. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
38. CLSI M100-S20 (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

39. Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ (2013) Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* 13: 632–642.
40. Donskey C (2013) Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections? *Am J Infect Control* 41: S12–S19.
41. Shu M, Wang Y, Yu J, Kuo S, Coda A, et al. (2013) Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 8: e55380.
42. Levkovich T, Poutahidis T, Smillie C, Varian BJ, Ibrahim YM, et al. (2013) Probiotic bacteria induce a ‘glow of health’. *PLoS One* 8: e53867.
43. Ohlsson C, Engdahl C, Fak F, Andersson A, Windahl SH, et al. (2014) Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS One* 9: e92368.
44. Woo J, Ahn J (2013) Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 56: 307–313.
45. Christiaen SE, Matthijs N, Zhang XH, Nelis HJ, Bossier P, et al. (2014) Bacteria that inhibit quorum sensing decrease biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Pathog Dis* 70: 271–279.
46. Beric T, Stankovic S, Draganic V, Kojic M, Lozo J, et al. (2013) Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample. *J Appl Microbiol*.
47. Ustok FI, Packman LC, Lowe CR, Christie G (2014) Spore germination mediated by *Bacillus megaterium* QM B1551 *SleL* and *YpeB*. *J Bacteriol* 196: 1045–1054.
48. de Boer AS, Diderichsen B (1991) On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 1–4.
49. Leonel Ochoa-Solano J, Olmos-Soto J (2006) The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol* 23: 519–525.
50. Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, et al. (2007) *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 957–967.
51. Porwal S, Lal S, Cheema S, Kalia VC (2009) Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS One* 4: e4438.
52. Ran C, Carrias A, Williams MA, Capps N, Dan BC, et al. (2012) Identification of *Bacillus* strains for biological control of catfish pathogens. *PLoS One* 7: e45793.
53. Al-Ajlani MM, Sheikh MA, Ahmad Z, Hasnain S (2007) Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmaceutical commercial medium. *Microb Cell Fact* 6: 17.
54. Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, et al. (2014) Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 9: e92486.
55. Adam M, Heuer H, Hallmann J (2014) Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PLoS One* 9: e90402.

56. Barnes AG, Cerovic V, Hobson PS, Klavinskis LS (2007) *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *Eur J Immunol* 37: 1538–1547.
57. de Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RC, Amorim JH, et al. (2014) *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One* 9: e87454.
58. Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, et al. (2010) Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine* 28:1021–1030.
59. Lee S, Belitsky BR, Brown DW, Brinker JP, Kerstein KO, et al. (2010) Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 28: 6658–6665.
60. Amuguni JH, Lee S, Kerstein KO, Brown DW, Belitsky BR, et al. (2011) Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. *Vaccine* 29: 4778–4784.
61. Permpoonpattana P, Hong HA, Phetcharaburanin J, Huang JM, Cook J, et al. (2011) Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. *Infect Immun* 79: 2295–2302.
62. Amuguni H, Lee S, Kerstein K, Brown D, Belitsky B, et al. (2012) Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. *Microbes Infect* 14: 447–456.
63. Hinc K, Stasilojc M, Piatek I, Peszynska-Sularz G, Isticato R, et al. (2014) Mucosal Adjuvant Activity of IL-2 Presenting Spores of *Bacillus subtilis* in a Murine Model of *Helicobacter pylori* Vaccination. *PLoS One* 9: e95187.
64. Chen YC, Sheng WH, Wang JT, Chang SC, Lin HC, et al. (2011) Effectiveness and limitations of hand hygiene promotion on decreasing healthcare-associated infections. *PLoS One* 6: e27163.
65. Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, et al. (2000) Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. *Infection Control Programme. Lancet* 356: 1307–1312.
66. Larsen N, Stuer-Lauridsen B, Cantor MD, Nielsen B, Brockmann E, et al. (2014) Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as a probiotic additives in pig feed. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 1105–1118.