TRADUZIONE DELL'ARTICOLO: Bini, F., Soffritti, I., D'Accolti, M., Mazziga, E., Caballero, J. D., David, S., Argimon, S., Aanensen, D. M., Volta, A., Bisi, M., Mazzacane, S., & Caselli, E. (2025). Profiling the resistome and virulome of Bacillus strains used for probiotic-based sanitation: a multicenter WGS analysis. *BMC genomics*, 26(1), 382. https://doi.org/10.1186/s12864-025-11582-1

Caratterizzazione del resistoma e del viruloma dei ceppi di *Bacillus* utilizzati per la sanificazione a base di probiotici: un'analisi WGS multicentrica

Francesca Bini [1,2], Irene Soffritti [1,2], Maria D'Accolti [1,2], Eleonora Mazziga [1,2], Julio Diaz Caballero [3], Sophia David [3], Silvia Argimon [3], David M. Aanensen [3], Antonella Volta [2], Matteo Bisi [2], Sante Mazzacane [2], Elisabetta Caselli [1,2,*]

[1] *Laboratorio di Microbiologia, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Prevenzione, e LTTA, Università di Ferrara, 44121 Ferrara, Italia; francesca.bini@unife.it; irene.soffritti@unife.it; maria.daccolti@unife.it; eleonora.mazziga@unife.it; csb@unife.it*
[2] *Centro di ricerca CIAS, Università di Ferrara, 44122 Ferrara, Italia; antonella.volta@unife.it; matteo.bisi@unife.it; sante.mazzacane@unife.it*
[3] *Centre for Genomic Pathogen Surveillance, Big Data Institute, Università di Oxford, Oxford, Regno Unito; julio.diaz@cgps.group; sophia.david@cgps.group; silvia.argimon@cgps.group; david.aanensen@cgps.group*

*****Corrispondenza: Elisabetta Caselli, Laboratorio di Microbiologia, Dipartimento di Scienze Ambientali e della Prevenzione, e LTTA, Università di Ferrara, 44121 Ferrara, Italia; e-mail: csb@unife.it

Abstract

Background. Le infezioni correlate all'assistenza sanitaria (ICA), causate da microbi che acquisiscono resistenza antimicrobica (AMR), rappresentano una minaccia globale crescente per la salute umana. L'elevato utilizzo di disinfettanti chimici volti a ridurre la presenza di

agenti patogeni nell'ambiente ospedaliero può allo stesso tempo favorire la selezione di ceppi resistenti, aggravando potenzialmente i problemi di resistenza antimicrobica. Nella ricerca di metodi sostenibili per controllare la contaminazione microbica senza incidere su questo aspetto, è stata proposta la sanificazione a base di probiotici (PBS) che utilizza ceppi di *Bacillus* spp. per ottenere una riduzione stabile di patogeni, resistenza antimicrobica e infezioni ospedaliere associate. Sebbene i probiotici del genere *Bacillus* siano classificati come non patogeni, non sono ancora disponibili dati completi sulle potenziali alterazioni genetiche di questi probiotici a seguito di un contatto prolungato con agenti patogeni circostanti. Questo studio propone quindi di analizzare in modo approfondito il contenuto genetico degli isolati PBS-*Bacillus* per valutare eventuali variazioni verificatesi durante il loro utilizzo.

Risultati. L'analisi WGS è stata utilizzata per l'identificazione accurata delle specie di PBS-*Bacillus* e per la caratterizzazione dettagliata dei loro SNP, resistoma, viruloma e mobiloma. Sono state condotte analisi sia sul detergente PBS originale sia su 172 isolati ambientali provenienti da otto ospedali sanificati con PBS in un periodo totale di 30 mesi. Le due specie *B. subtilis* e *B. velezensis* sono state identificate sia nel prodotto originale sia nell'ambiente ospedaliero e l'analisi degli SNP ha rivelato la presenza di due cluster in ciascuna specie. Non sono stati rilevati geni di virulenza/resistenza o plasmidi coniugativi mobili né nei ceppi PBS-*Bacillus* originali né in nessuno degli isolati ambientali analizzati, il che conferma la loro elevata stabilità genetica e la loro bassa/nulla tendenza a essere coinvolti in eventi di trasferimento genico orizzontale.

Conclusioni. I dati ottenuti dall'analisi metagenomica hanno rivelato l'assenza di sequenze genetiche mutate associate a PBS-*Bacillus* e la mancanza di alterazioni in tutti gli isolati ambientali analizzati, nonostante il loro continuo contatto con i patogeni circostanti. Questi risultati supportano la sicurezza delle specie di *Bacillus* analizzate. Ulteriori studi metagenomici volti a caratterizzate l'intero genoma di queste e di altre specie di *Bacillus*, possibilmente durante periodi più lunghi e in condizioni di stress, sarebbero di interesse poiché potrebbero fornire un'ulteriore conferma della loro stabilità e sicurezza.

Parole chiave: resistoma, viruloma, WGS, probiotici, igiene, *Bacillus*

Background

La contaminazione microbica persistente dell'ambiente ospedaliero è stata associata a un aumento del rischio di contrarre infezioni correlate all'assistenza sanitaria (ICA), che rappresentano una preoccupazione globale crescente [1, 2]. Le ICA colpiscono oltre 4,3 milioni

di persone all'anno solo nella Comunità Europea, causando circa 91.000 decessi attribuibili in gran parte a sei principali tipi di ICA (polmonite associata all'assistenza sanitaria, infezione del tratto urinario, infezione del sito chirurgico, infezione da *C. difficile*, sepsi neonatale e infezione primaria del torrente ematico), secondo uno studio basato sull'indagine Point Prevalence Survey (PPS) del 2011-2012 effettuata dall'European Centre for Disease Control (ECDC) [3, 4]. Inoltre, secondo l'ECDC PPS-2024, le infezioni ospedaliere rappresentano un importante problema di salute pubblica in Italia, colpendo il 9,8% dei pazienti ricoverati, mentre la prevalenza mediana nei paesi UE/SEE è del 6,8% [3].

Il controllo della contaminazione microbica ospedaliera, essenziale per prevenire il rischio di ICA, è stato effettuato attraverso l'uso di disinfettanti chimici, il cui utilizzo è ulteriormente aumentato durante la pandemia di COVID-19 nel tentativo di prevenire la trasmissione di SARS-CoV-2 attraverso superfici contaminate [5, 6]. Sebbene i disinfettanti siano rapidamente efficaci, presentano diverse limitazioni importanti, tra cui l'azione temporanea [7, 8], l'elevato impatto ambientale e la tendenza ad aumentare il grado di resistenza antimicrobica (AMR) nei potenziali patogeni umani [9]. Il fenomeno della resistenza crociata tra disinfettanti e antimicrobici è stato segnalato per diversi disinfettanti ed è associato a un ulteriore aumento dell'AMR durante il periodo pandemico [5, 10, 11]. D'altro canto, secondo i dati dell'ECDC, le infezioni ospedaliere sono sempre più causate da patogeni difficili da trattare, che possono diventare potenzialmente fatali per i pazienti ricoverati in ospedale a causa dei loro elevati livelli di resistenza antimicrobica [3, 12–15]. Infatti, la resistenza antimicrobica è diventata una delle principali minacce per la salute umana, emergendo e diffondendosi, in particolare negli ambienti ospedalieri, a seguito delle pressioni selettive esercitate dall'uso diffuso di disinfettanti e antibiotici in questi contesti [16]. Di conseguenza, i microrganismi che contaminano persistentemente l'ambiente ospedaliero sono spesso drug, multidrug (MDR) o totally drug resistant (TDR), i quali rappresentano una minaccia significativa per la salute pubblica, in quanto possono causare infezioni gravi/letali e diffondersi in altri contesti sanitari e non sanitari, compresi gli ambienti comunitari e i trasporti di massa [17–20].

Sulla base dell'attuale diffusione dell'AMR, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha lanciato l'allarme sul rischio di future pandemie di AMR [21] e ha stimato che entro il 2050 potrebbero verificarsi almeno 10 milioni di decessi all'anno se non verranno adottate misure concrete e urgenti a livello globale [22]. In linea con ciò, molti paesi hanno adottato misure proattive per combattere la resistenza antimicrobica, introducendo politiche volte a ridurre l'uso generale di antibiotici negli ambienti sanitari e non sanitari, secondo l'approccio "One Health" [23], supportando programmi di sorveglianza e introducendo procedure per prevenire

la diffusione di microrganismi resistenti [24, 25]. I principi “One Health” si basano sulla consapevolezza che per preservare la salute umana è necessario tenere conto sia della salute degli animali sia di quella dell’ambiente. Il controllo di tutti questi fattori può essere necessario per raggiungere efficacemente gli obiettivi sanitari, poiché microrganismi, resistenza antimicrobica e inquinanti si diffondono circolarmente all’interno di queste aree. In particolare, affrontare la resistenza antimicrobica e il controllo del rischio infettivo attraverso approcci ambientalmente sostenibili può prevenire un ulteriore inquinamento del suolo e dell’acqua, preservare la salute degli animali e delle piante e, in ultima analisi, la salute umana stessa. Questi principi sono stati ampiamente riconosciuti dall’OMS nell’ultimo decennio, diventando un riferimento chiave per il controllo dell’AMR e delle infezioni [26].

Poiché il controllo della contaminazione microbica negli ambienti sanitari è una pratica essenziale per prevenire le infezioni ospedaliere e garantire la sicurezza dei pazienti [3, 27], diversi studi recenti si sono concentrati sulla ricerca di nuovi potenziali approcci igienico-sanitari a lungo termine, progettati con l’idea di non peggiorare l’inquinamento di suolo e acqua e le preoccupazioni relative alla resistenza antimicrobica.

Per raggiungere questo obiettivo, sono stati messi a punto e testati metodi di sanificazione basati sull’utilizzo di probiotici (PBS), che hanno dimostrato la loro capacità di ridurre stabilmente i patogeni ospedalieri negli ambienti trattati, senza la conseguente selezione di ceppi resistenti. In particolare, il Probiotic Cleaning Hygiene System (PCHS®) è un sistema brevettato basato sull’uso di un detergente completamente ecologico contenente spore di probiotici selezionati appartenenti al genere *Bacillus* (nello specifico, le specie *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. megaterium*). Dopo la diluizione in acqua e la distribuzione sulle superfici durante la procedura di pulizia, le spore germinano, generando batteri vegetativi, in grado di rimuovere lo sporco organico mediante digestione enzimatica, dislocando al contempo i patogeni circostanti tramite meccanismi competitivi [28]. È stato dimostrato che questo tipo di igienizzazione riduce i patogeni superficiali dell’80% in più rispetto ai disinfettanti chimici, senza selezionare ceppi resistenti, ma piuttosto riducendo la prevalenza di AMR preesistente fino al 99,9%, con conseguente riduzione di oltre il 50% dell’incidenza delle infezioni ospedaliere [8, 29–35]. È stato inoltre dimostrato che il PCHS fornisce in vitro una decontaminazione di lunga durata dai virus dotati di envelope [8] e il suo utilizzo è stato altresì testato durante la pandemia di COVID-19, mostrando un’efficacia significativa contro SARS-CoV-2 sia in ambienti sanitari che non sanitari [20, 36].

Risultati analoghi sono stati osservati anche con l’impiego di altre formulazioni di PBS, inclusi i probiotici del genere *Bacillus*, evidenziando una superiore efficacia generale nel controllo dei

patogeni nosocomiali e dell'AMR [37] rispetto ai disinfettanti o ad altri detergenti convenzionali [38]. Sulla base di questi dati, una raccomandazione recentemente pubblicata dalla Commissione per l'igiene ospedaliera e la prevenzione delle infezioni del Robert Koch Institute ha incluso la pulizia probiotica come un metodo sostenibile per fornire un microbioma stabile a lungo termine senza favorire lo sviluppo di resistenza crociata agli antibiotici [39].

Tuttavia, data l'elevata suscettibilità e fragilità dei pazienti ricoverati, un aspetto importante da considerare per qualsiasi procedura di igienizzazione ospedaliera è la sicurezza d'uso, per garantire che non rappresenti alcun rischio per i pazienti ricoverati. Poiché si utilizzano microrganismi vivi, la sicurezza dell'uso del PBS rappresenta un punto critico da valutare.

I probiotici *Bacillus* sono classificati "Generally Regarded As Safe" (GRAS) dalla Food and Drug Administration (FDA) [40] e dalla European Food Safety Authority (EFSA) [41]. Secondo il recente documento dell'EFSA, i requisiti per essere inclusi nel gruppo "Qualified Presumpion of Safety" (QPS) includono la mancanza di patogenicità e l'assenza di geni di resistenza acquisiti [42]. La maggior parte delle specie di *Bacillus*, incluso il gruppo *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. velezensis* e altre specie di *Bacillus*, soddisfano questi requisiti [43]. I probiotici *Bacillus* spp. sono stati utilizzati in modo sicuro per decenni in numerose applicazioni volte a preservare la salute umana, animale e vegetale [28, 31], e gli studi sulla sorveglianza microbiologica durante il loro utilizzo come agenti di sanificazione in strutture che hanno implementato l'utilizzo del PCHS hanno evidenziato l'assenza sia di infezioni causate da *Bacillus* sia di campioni clinici positivi a *Bacillus* in più di 30.000 test, corrispondenti a circa 90.000 pazienti ospedalizzati [32]. Inoltre, le analisi PCR non hanno rivelato alcun gene R di nuova acquisizione in circa 500 ceppi PCHS-*Bacillus* derivati dagli ospedali trattati [32, 35].

Tuttavia, mancava ancora una caratterizzazione approfondita dell'intero contenuto genetico dei PCHS-*Bacillus* prima e dopo il contatto prolungato con agenti patogeni sulle superfici trattate. È invece essenziale indagare la stabilità genetica dei *Bacillus* per escludere potenziali alterazioni dannose legate allo scambio genetico con batteri vicini, soprattutto quando i *Bacillus* vengono utilizzati per il PBS in ambito ospedaliero. Ciò è dovuto alla presenza in questo contesto di numerosi microbi resistenti e virulenti, che possono trasferire geni di resistenza o virulenza ai probiotici *Bacillus*. Inoltre, il genere *Bacillus* comprende numerose specie con caratteristiche diverse [44], e vi è una crescente necessità di valutare le singole specie e ceppi di *Bacillus* caso per caso e secondo necessità [45]. D'altro canto, i pazienti ospedalizzati sono particolarmente suscettibili alle infezioni causate da ogni tipo di microrganismo, pertanto la valutazione della stabilità genetica dei *Bacillus* appare ancora più

necessaria in questo contesto. Inoltre, studi sulla sicurezza sono stati condotti principalmente per l'uso dei probiotici *Bacillus* come additivi alimentari negli esseri umani, anche di recente [46], ma sono invece carenti gli studi riguardanti il loro utilizzo come agenti di sanificazione nel PBS. Colmare questa lacuna nella letteratura e fornire prove della stabilità a lungo termine dei *Bacillus* inclusi nel PBS ne supporterebbe l'utilizzo sicuro negli ospedali e di conseguenza in molti ambienti non sanitari e meno complessi.

Pertanto, questo studio si propone di valutare la loro stabilità rispetto all'acquisizione di geni di resistenza e virulenza durante il loro utilizzo come agenti di sanificazione, di caratterizzare il loro intero resistoma e viruloma e di identificare le loro caratteristiche originali e qualsiasi potenziale cambiamento che potrebbe essersi verificato a seguito del contatto con agenti patogeni ospedalieri. A questo scopo, abbiamo eseguito il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) di ceppi di PCHS-*Bacillus* isolati da otto diversi ospedali italiani in un periodo di 30 mesi per verificarne la stabilità genetica, convalidandone così la sicurezza per l'utilizzo nei sistemi di igienizzazione associati.

Metodi

Progettazione dello studio

L'analisi è stata eseguita su un totale di circa 200 isolati di *Bacillus* raccolti in otto strutture sanitarie (HS) italiane, originariamente arruolate in studi precedenti volti a testare l'efficacia del PCHS, dal 20 gennaio 2015 al 28 giugno 2017, per un periodo totale di 30 mesi [34, 35]. Gli ospedali erano localizzati in diverse aree geografiche d'Italia, tra cui le seguenti città: Ferrara (due ospedali: HS-1, un ospedale universitario pubblico, e HS-2, un ospedale privato), Feltre (HS-3), Foggia (HS-4), Pavia (HS-5), Roma (HS-6), Tolmezzo (HS-7) e Vigevano (HS-8). Durante il periodo di studio, il PCHS è stato utilizzato quotidianamente nei reparti di medicina generale di tutti gli ospedali arruolati, in sostituzione della disinfezione chimica convenzionale basata su prodotti a base di cloro e disinfettanti a base di alcol. Il prodotto utilizzato nel PCHS era costituito da un detergente con marchio ecologico contenente detergenti anionici e non ionici con pH neutro e comprendente $5x10^7$ spore di probiotici per ml (Copma Scpa, Ferrara, Italia).

Come parte degli studi PCHS, ogni HS arruolata è stata monitorata eseguendo regolari campionamenti ambientali microbici raccogliendo campioni di superficie sette ore dopo la sanificazione [7, 34, 35]. Sono state eseguite campagne di campionamento da 3 a 24 mesi dopo l'introduzione del PCHS, con intervalli di tempo dipendenti dal tipo di studio, che includevano

due studi monocentrici (in entrambi gli ospedali di Ferrara) e uno studio multicentrico comprendente tutti gli altri ospedali. In breve, da 3 a 24 mesi in HS-1, da 2 a 6 mesi in HS-2, a 3, 9 e 12 mesi in HS-3 e a 3 e 6 mesi in tutte le restanti HS. Per tutte le HS arruolate, i campioni sono stati raccolti in duplice copia mediante l'utilizzo di piastre da contatto RODAC per il rilevamento e la conta di microrganismi da lavandini, pavimenti e pediere dei letti delle stanze dei reparti [34].

Le colonie di *Bacillus* sono state isolate su piastre RODAC contenenti terreno di coltura Baird-Parker, come precedentemente descritto [20, 34]. Le singole colonie di *Bacillus* spp. sono state quindi amplificate tramite incubazione di 24 ore in 5 ml di brodo di coltura Tryptic Soy Broth a 37°C sotto leggera agitazione. Le cellule microbiche sono state quindi raccolte mediante centrifugazione a 14.000 × g per 5 minuti e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Allo stesso modo, singole colonie di *Bacillus* provenienti dal detergente PCHS originale sono state isolate su piastre Baird-Parker RODAC [35]. Sono state eseguite analisi molecolari sia sugli isolati ambientali di PCHS-*Bacillus* sia sui ceppi originali di PCHS-*Bacillus*.

Estrazione del DNA

Il DNA totale è stato estratto dai pellet microbici mediante il kit QIAmp UCP Pathogen Mini (Qiagen, Hilden, Germania) seguendo le istruzioni del produttore [33, 34]. La purezza del DNA degli isolati di *Bacillus* è stata stimata mediante letture spettrofotometriche a lunghezze d'onda di 260/280 nm tramite uno spettrofotometro NanoDrop (Nanodrop Technologies Inc., USA). La concentrazione è stata ulteriormente determinata utilizzando un fluorimetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Prima delle analisi successive, l'amplificabilità di ciascun campione di DNA estratto è stata verificata mediante una PCR panbatterica disegnata per amplificare la regione conservata del gene 16S rRNA, come descritto in precedenza [35].

Identificazione delle specie di *Bacillus*

Ogni isolato di *Bacillus*, sia proveniente dal detergente PCHS che dall'ambiente ospedaliero, è stato inizialmente identificato tramite PCR e sequenziamento dell'amplicone, come precedentemente descritto [35]. In breve, 10 ng di DNA estratto sono stati amplificati mediante PCR del gene codificante l'rRNA 16S e gli ampliconi risultanti lunghi 400 bp sono stati sequenziati e confrontati mediante l'utilizzo del database BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) [35]. Sulla base di questi risultati, solo gli isolati ambientali riconosciuti come specie di *Bacillus* derivati dal detergente PCHS sono stati inclusi nelle analisi successive mediante WGS.

Analisi di sequenziamento dell'intero genoma (WGS)

Ogni isolato di *Bacillus*, sia dal detergente PCHS che dall'ambiente ospedaliero, è stato successivamente analizzato mediante WGS presso l'Oxford Genomics Centre (Università di Oxford, Regno Unito). Tutti i campioni raccolti sono stati analizzati simultaneamente. In breve, per il sequenziamento sono stati utilizzati 1000 ng di DNA, la costruzione della libreria è stata eseguita mediante utilizzo del kit NEBNext Ultra (NEB, Ipswich, MA, USA) seguendo un protocollo di automazione personalizzato per l'uso di Biomek FX (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) e la frammentazione del DNA è stata eseguita con un sonicatore Episonic (Epigentek, Farmingdale, NY, USA). Il sequenziamento è stato eseguito su una SP flow cell lane di Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA). Le letture delle sequenze per le successive analisi sono state emesse in formato fastq.

Controllo qualità del sequenziamento e analisi bioinformatica

Tutti i dati relativi alle sequenze dei genomi sono stati elaborati mediante pipeline specializzate che includevano l'assemblaggio de novo, metodi per l'analisi filogenetica basati sulla mappatura degli SNP e il rilevamento di AMR e determinanti di virulenza, come spiegato successivamente. Ciascuna pipeline utilizzata in questo studio è stata eseguita e gestita attraverso il Biomedical Research Cluster dell'Università di Oxford ed è stata implementata in Nextflow v21.10.6 e monitorata tramite l'interfaccia Nf-tower [47]. La struttura del flusso di lavoro è riassunta nella **Figura 1**.

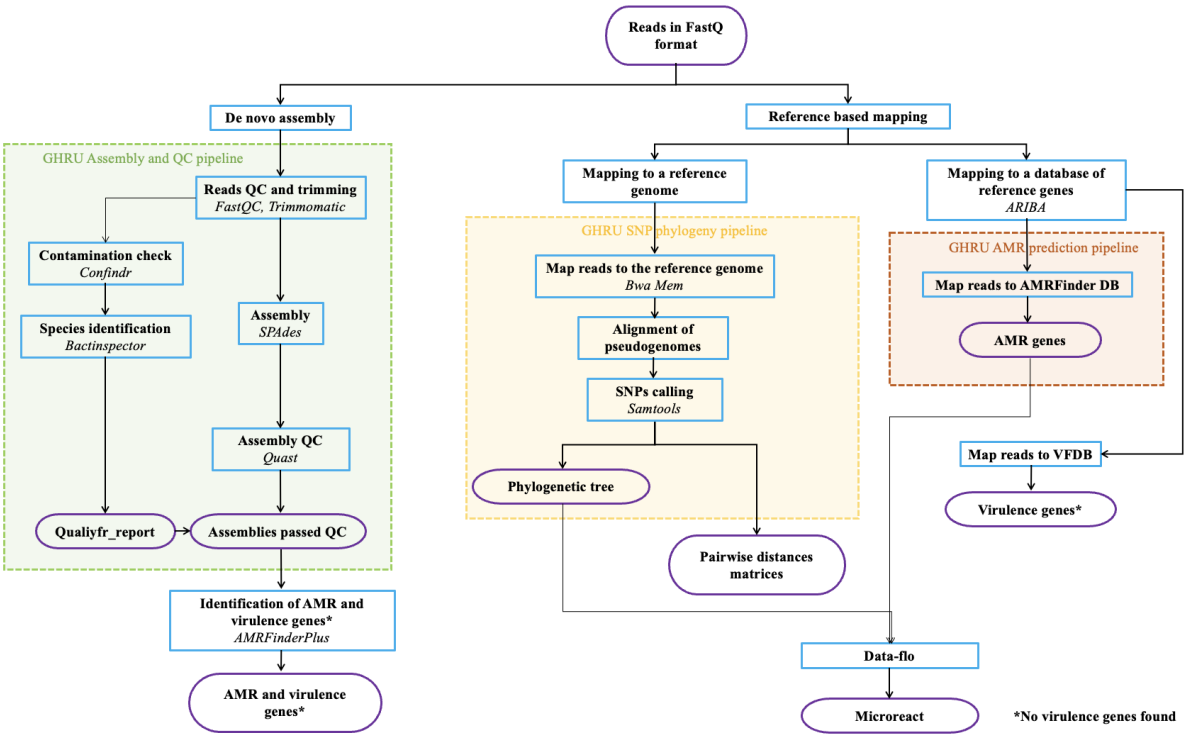

Figura 1. Panoramica del flusso di lavoro bioinformatico utilizzato per analizzare i genomi di *Bacillus*. I cerchi viola rappresentano gli input/output. Le caselle blu rappresentano le attività che forniscono una determinata funzionalità (indicata in grassetto). I riquadri tratteggiati rappresentano le pipeline. I principali pacchetti software utilizzati sono indicati in corsivo.

I genomi sono stati inizialmente assemblati per ottenere informazioni sulla loro qualità mediante l'utilizzo della pipeline "Assembly and Quality Control (QC)" [48] sviluppata dalla Global Health Research Unit (GHRU) come parte della Genomic Surveillance of Antimicrobial Resistance [49]. L'input della pipeline di assemblaggio e controllo qualità era una cartella contenente coppie corrispondenti di letture fastq, ottenute come output dal sequenziatore. La dimensione del genoma è stata stimata tramite Mash v2.1 [50] e, successivamente, le letture sono state tagliate per rimuovere gli adattatori tramite Trimmomatic v0.39 [51]. La pipeline di assemblaggio e controllo qualità ha utilizzato FastQC v0.11.9 per riassumere le metriche di qualità prima e dopo sia il taglio degli adattatori che il controllo di qualità delle letture [52]. Le letture sono state successivamente utilizzate per identificare le specie con Bactinspector v0.1.3 [53] e la potenziale contaminazione è stata valutata tramite Confindr v0.7.2 [54]. Le letture risultanti sono state utilizzate con SPAdes v3.15.3 per l'assemblaggio [55], e quindi Quast v5.0.2 è stato utilizzato per riassumere le metriche di assemblaggio di ciascun genoma [56]. Infine, tutte le metriche di qualità sono state combinate tramite MultiQC v1.11 e Qualifyr v1.4.6 per generare un report con i risultati di tutti i passaggi della pipeline di assemblaggio

per tutti i genomi [57, 58]. Gli assemblaggi dei genomi dei *Bacillus* sono stati successivamente caricati e analizzati tramite PathogenWatch [59] per valutare l'ID della specie e l'MLST (tipizzazione sequenziale multilocus) e per selezionare il ceppo di riferimento più appropriato per generare successivi allineamenti. A tal fine, è stata utilizzata la pipeline "SNP phylogeny" [60] per mappare le letture di sequenza sui genomi di riferimento selezionati mediante BWA-MEM v0.7.17 [61]. Nello specifico, sono stati utilizzati due genomi di riferimento per l'identificazione delle specie PCHS-*Bacillus*: *B. subtilis subsp.* inaquosorum ceppo DE111 [numero di accesso GenBank: CP013984.1] [62] e *B. velezensis* ceppo BT2.4 [numero di accesso NCBI RefSeq: NZ_CP085505.1] [63]. SAMtools v1.9 e SNP sites v2.4.1 sono stati utilizzati per identificare gli SNP [64, 65], che sono stati successivamente utilizzati per generare alberi filogenetici di massima verosimiglianza con 1000 bootstrap tramite IQ-Tree v1.6.8 [66].

Durante l'analisi PathogenWatch, sono state anche identificate le sequenze dei repliconi plasmidici mediante Inctyper, uno strumento implementato in PathogenWatch che utilizza PlasmidFinder v2.0.1 per identificare i contig contenenti i geni Inc. del plasmide [67, 68].

La ricerca dei determinanti di AMR e virulenza è stata eseguita utilizzando sia lo strumento AMRFinderPlus v3.10.45, che utilizza un database di riferimento in grado di utilizzare gli assemblaggi come input per il rilevamento, sia lo strumento ARIBA v2.14.4, che invece consente di mappare le letture delle sequenze su diversi database di geni di riferimento [69, 70]. Lo strumento AMRFinderPlus v3.10.45 che utilizza la versione 2022-10-11.2 del database AMRFinder ha identificato i geni AMR e classi di geni aggiuntive, inclusi i fattori di virulenza, mentre lo strumento ARIBA v2.14.4 è stato implementato tramite la pipeline "AMR prediction" utilizzando la versione 2022-01-31 del database AMRFinder e la versione 2021-02-17 del database PointFinder in parallelo per determinare la presenza di geni AMR [71]. Inoltre, lo strumento ARIBA v2.14.4 è stato utilizzato con la versione VFDB 2020-01-06 per l'identificazione dei fattori di virulenza [72].

Infine, le differenze a livello degli SNP sono state calcolate per tutti gli isolati di *Bacillus* utilizzando lo strumento Pairsnp v.0.0.7 [73] per identificare possibili cambiamenti nei genomi di *Bacillus*.

L'analisi statistica dei dati ottenuti per le analisi filogenetiche e di resistenza/virulenza è stata effettuata utilizzando metriche di qualità implementate in ciascuno dei pacchetti software utilizzati, similmente a quanto precedentemente riportato [74, 75].

Visualizzazione dei dati

Per ottenere informazioni fruibili, era necessario integrare i dati epidemiologici e genomici nella visualizzazione finale. A questo scopo, abbiamo utilizzato Data-flo [76] per combinare i dati genomici e i metadati dei *Bacillus*, compresi i dati geografici, con le informazioni ottenute dall'analisi delle AMR. L'insieme dei dati è stato caricato nello strumento di visualizzazione Microreact [77] insieme agli alberi filogenetici per *B. subtilis* e *B. velezensis*.

Risultati

Isolati di *Bacillus*

Circa 200 isolati di *Bacillus* precedentemente raccolti in un periodo di 30 mesi da otto ospedali italiani regolarmente sanificati dal PCHS [7, 34, 35, 78] sono stati inclusi nell'analisi molecolare. Sono state inoltre analizzate singole colonie di *Bacillus* raccolte direttamente dal detergente PCHS originale. L'identificazione iniziale di ciascun isolato di *Bacillus* è stata effettuata tramite PCR e sequenziamento di ampliconi per stabilirne la specie presunta. Nel detergente originale sono state identificate due specie, *B. subtilis* e *B. pumilus*, anche se sulla base dell'etichetta di composizione del prodotto ci si aspettava che contenesse anche la specie *B. megaterium*. Allo stesso modo, le due specie *B. subtilis* e *B. pumilus* sono state riconosciute in tutti gli isolati ambientali, come dimostrato dai risultati del sequenziamento degli ampliconi. Il successivo sequenziamento de novo ha inoltre rivelato che 172/200 isolati derivavano effettivamente dal detergente PCHS e sono stati quindi arruolati per la successiva analisi WGS, insieme ai due ceppi originali PCHS-*Bacillus*. Complessivamente, 69 isolati derivavano da HS-1, 19 da HS-2, 36 da HS-3, 11 da HS-4, 9 da HS-5, 10 da HS-6, 10 da HS-7 e 8 da HS-8. La **Tabella 1** riassume il numero di campagne di campionamento e il numero totale di *Bacillus* isolati da ciascuna delle HS arruolate, nonché il tipo di superficie da cui sono stati raccolti.

Tabella 1. Suddivisione dei 172 campioni di *Bacillus* in base a: struttura sanitaria, città, campagne di campionamento, mesi dopo l'applicazione del PCHS e superfici ospedaliere campionate.

Strutture sanitarie (HS)	**N. di campionamenti**	**Campagne di campionamento[1]**	**N. di isolati di *Bacillus***			
			Lavandino	**Pavimento**	**Pediera del letto**	**Totale**
HS-1	8	3,6,9,12,15,18,21,24	24	22	23	69
HS-2	4	2,4,5,6	6	7	6	19
HS-3	3	3,9,12	11	14	11	36
HS-4	2	3,6	3	4	4	11

HS-5	2	3,6	3	3	3	9
HS-6	2	3,6	2	5	3	10
HS-7	2	3,6	3	4	3	10
HS-8	2	3,6	2	4	2	8

[1] Le campagne di campionamento sono espresse in numero di mesi dopo la prima applicazione del PCHS.

Assemblaggio del genoma e controllo qualità

Tra i 172 genomi derivati da isolati PCHS-*Bacillus*, 23 (23/172, 13%) non hanno superato il controllo qualità (QC) dell'assemblaggio a causa della presenza di più ceppi di *Bacillus* o della contaminazione da parte di materiale genetico di altre specie, tra cui *Enterobacter hormaechei* e *Bacillus licheniformis*. Di conseguenza, solo i 149 genomi che hanno superato il controllo qualità, insieme ai due genomi derivanti dal detergente, sono stati inclusi nelle analisi successive.

In primo luogo, l'assegnazione delle specie è stata effettuata tramite il software Bactinspector, basato sull'assemblaggio delle sequenze. I risultati hanno rivelato che gli isolati raccolti includevano due specie di *Bacillus* spp., *B. subtilis* (105/149, 70,5%) e *B. velezensis* (44/149, 29,5%). Questi dati sono stati confermati tramite l'applicazione web Pathogenwatch, che ha permesso di distinguere ulteriormente i genomi di *B. subtilis* in due diversi tipi di sequenza (ST), ST13 (101/105, 96,2%) e ST47 (4/105, 3,8%). Inoltre, i ceppi derivanti direttamente dal detergente PCHS, analizzati in parallelo, sono stati identificati come *B. subtilis* e *B. velezensis*, il che indica che la precedente identificazione della specie *B. pumilus* tramite sequenziamento dell'amplicone non era precisa.

Diversità genetica tra gli isolati di *Bacillus*

Per indagare la presenza di eventuali variazioni genetiche tra i genomi della stessa specie, abbiamo prodotto due allineamenti basati su genomi di riferimento comprendenti solo i genomi di *B. subtilis* e *B. velezensis*, inclusi i ceppi di *B. subtilis* e *B. velezensis* ottenuti dal detergente, e abbiamo dedotto due alberi filogenetici (**Figura 2** e **Figura 3**). L'analisi filogenetica ha confermato la presenza di due diversi genotipi identificati con MLST per *B. subtilis*, raggruppando i genomi nei due gruppi ST13 (101/105 genomi) e ST47 (4/105 genomi). Tra questi, il gruppo principale ST13 comprendeva campioni raccolti da tutte le superfici di otto HS in più punti temporali diversi nel periodo di 30 mesi, mentre il gruppo ST47 è stato ricavato interamente da HS-3 (pavimenti e pediere del letto) tra marzo e giugno 2017. Il genoma di *B. subtilis* derivato direttamente dal detergente apparteneva al gruppo ST13 (102 campioni totali).

Allo stesso modo, nonostante la mancanza di uno schema MLST, l'albero filogenetico ha anche rivelato due gruppi distinti tra i genomi di *B. velezensis*, un gruppo principale (35/45, 77,8%) e un gruppo minore (10/45, 22,2%), come mostrato nella **Figura 3**. Il clade principale di *B. velezensis* (34/44 genomi) derivava da HS-1 in un periodo di 22 mesi totali, mentre il clade minore (10/44 genomi) derivava da campioni raccolti da HS-7 (4 campioni) tra marzo e giugno 2017, da HS-3 (1 campione, settembre 2016) e da HS-2 (5 campioni) tra gennaio e marzo 2015. Il genoma di *B. velezensis* derivato direttamente dal detergente apparteneva al gruppo principale (35 campioni totali).

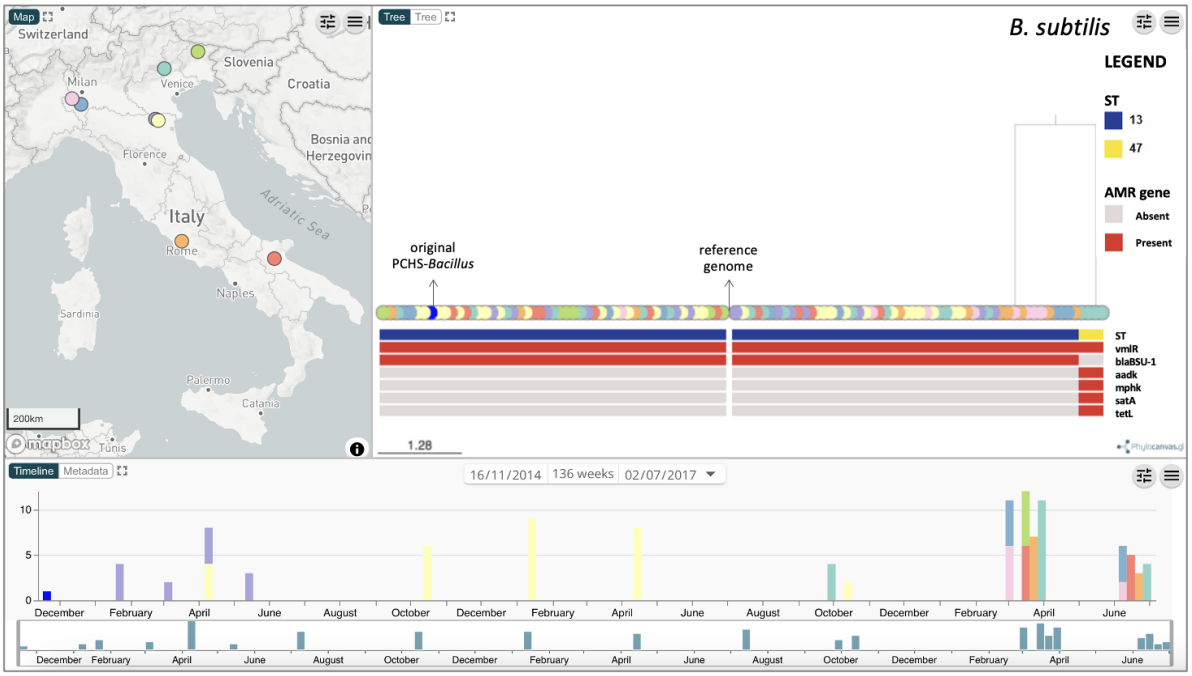

Figura 2. Visualizzazione ottenuta con Microreact dei genomi di *B. subtilis* collegati ai relativi dati geografici e temporali. L'albero filogenetico è stato dedotto mediante confronto tra gli SNP ottenuti mappando ciascun genoma sul genoma di riferimento *B.* subtilis DE111. I nodi dell'albero sono colorati a seconda dell'ospedale (mappa) e annotati con la distribuzione delle ST e delle AMR. Le frecce indicano il genoma di riferimento e il ceppo originale PCHS-*Bacillus* isolato direttamente dal detergente.

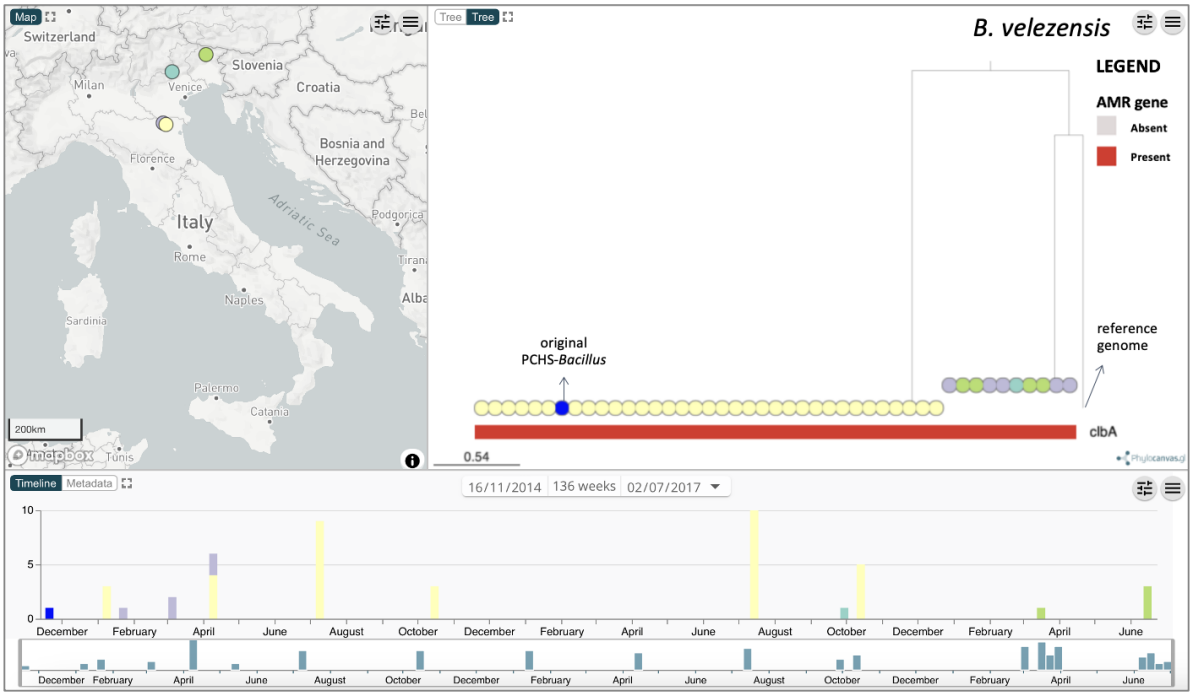

Figura 3. Visualizzazione ottenuta con Microreact dei genomi di *B. velezensis* collegati ai relativi dati geografici e temporali. L'albero filogenetico è stato dedotto mediante confronto tra dagli SNP ottenuti mappando ciascun genoma sul genoma di riferimento *B.* velezensis BT2.4. I nodi dell'albero sono colorati a seconda dell'ospedale (mappa) e annotati con la distribuzione delle AMR. Le frecce indicano il genoma di riferimento e il ceppo originale PCHS-*Bacillus* isolato direttamente dal detergente.

Rilevamento di differenze tra gli SNP

Poiché i genomi di *Bacillus* sono lunghi circa 5 Mbp e sono caratterizzati da un'omologia >90% tra le diverse specie, per comprendere meglio la diversità genomica di ciascun gruppo abbiamo quantificato le differenze a livello degli SNP presenti in seguito ad allineamento con il genoma di riferimento. I 102 genomi *B. subtilis* ST13 (101 isolati ambientali e 1 ceppo da detergente) differivano in media per 1 SNP (intervallo 0−2) (**Tabella 2**), mentre i quattro genomi *B. subtilis* ST47 erano identici (0 SNP). Come previsto, le differenze tra i genomi di questi due ST riflettevano l'elevata distanza filogenetica (media di 227.295 SNP; intervallo 227.158−227.486). Lo stesso è stato osservato per *B. velezensis*, dove i 10 genomi appartenenti al cluster minore differivano da quelli del cluster principale (34 isolati ambientali e 1 ceppo detergente) per una media di 35.950 SNP (intervallo 35.822 – 36.019). Al contrario, i genomi all'interno di ciascun cluster principale non presentavano alcuna differenza in termini di SNP (0 SNP).

Tabella 2. Riepilogo dei siti SNP diversi trovati nei genomi ST13 di *B. subtilis*, indicati riferendosi alla loro posizione sul genoma di riferimento DE111 (numero di accesso CP013984.1).

Posizione [1]	**Mutazione**[2]	**N. di genomi**[3]	**Locus tag/ intergenico**	**Prodotto genico**	**Codone mutato**	**Sin/ non-sin**	**Cambiamento amminoacidico**
6385	C→T	1	AN935_00110	Proteina xpaC	CGA→GTA	NS	Ala→Val
279482	Sol→La	2	AN935_01515	Trasportatore MFS	GCG→GCA	S	Ala
660533	C→T	3	AN935_03395	ATP-dipendente DNA elicasi PcrA	ACG→ATG	NS	Gio→Met
1104980	A→G	17	AN935_05450	Soluto di sodio simportatore	TGT→TGC	S	Cys
1975881	T→C	3	Intergenico	N / A	N / A	N / A	N / A

[1] Genoma di riferimento DE111 CP013984.1

[2] Allele maggioritario → allele minoritario

[3] Numero di genomi con allele minoritario

Concentrandoci sulle differenze a livello degli SNP tra i due ceppi originali e gli altri genomi dei rispettivi cluster, abbiamo scoperto che il ceppo originale *B. subtilis* ST13 (derivato direttamente dal detergente) differiva dai 101 isolati *B. subtilis* ST13 per una media di 1 SNP (intervallo 0–2), mentre il ceppo originale *B. velezensis* non ha mostrato alcuna differenza in termini di SNP rispetto ai 34 isolati *B. velezensis* (0 SNP).

La minore variabilità genetica rilevata nei genomi ST13 di *B. subtilis* è stata ulteriormente studiata identificando i loci contenenti le posizioni variabili evidenziate. Sono state identificate cinque posizioni variabili, quattro delle quali si trovano all'interno di regioni codificanti e una all'interno di una regione intergenica, rilevate in un totale di 23 genomi sui 102 analizzati, poiché tre genomi risultavano mutati in entrambi i geni AN935_05450 e AN935_03395 (**Tabella 2**).

Combinando le informazioni riguardo agli SNP ottenute dai 102 genomi ST13 di *B. subtilis* (101 isolati e 1 ceppo originale) con i relativi dati geografici, i risultati hanno mostrato che quattro genomi con mutazioni nel gene AN935_00110 sono stati raccolti dagli ospedali HS-6 e HS-7, due genomi con mutazioni nel gene AN935_01515 sono stati raccolti da HS-7 e HS-4 e 17 genomi con mutazioni nel gene AN935_05450 sono stati raccolti da cinque HS diversi. Tra i 17 genomi con mutazioni nel gene AN935_05450, tre genomi dell'HS-5 presentavano anche mutazioni nel gene AN935_03395. Tutti i campioni sono stati raccolti da diverse tipologie di superfici, tra cui pavimenti, lavandini e pediere del letto (**Figura 4**).

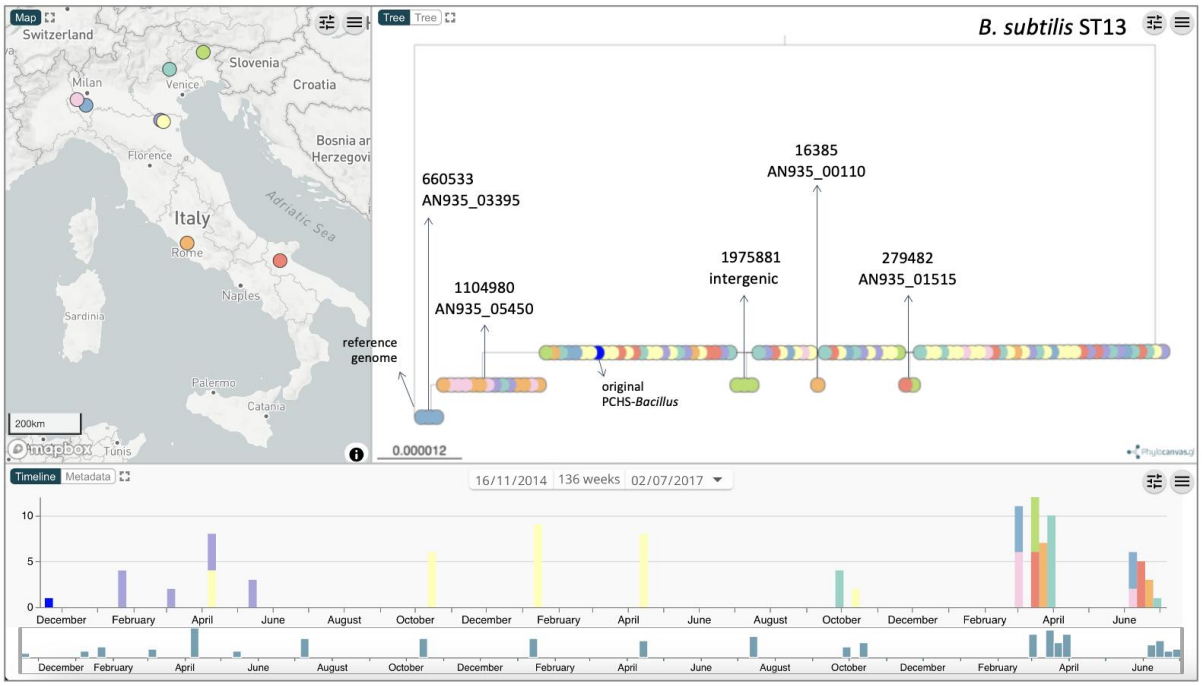

Figura 4. Visualizzazione ottenuta con Microreact dei genomi ST13 di *B. subtilis* collegati ai relativi dati geografici e temporali. I nodi dell'albero sono colorati a seconda dell'ospedale (mappa) e annotati con gli SNP condivisi dai genomi indicati dalle frecce. Le frecce indicano anche il genoma di riferimento e il ceppo originale PCHS-*Bacillus* isolato direttamente dal detergente.

Rilevamento di geni di resistenza antimicrobica e fattori di virulenza

L'identificazione dei geni AMR mediante gli strumenti AMRFinderPlus v3.10.45 e ARIBA v2.14.4 ha prodotto risultati concordanti, dimostrando che tutti gli isolati *B. subtilis* ST13, incluso il ceppo originale *B. subtilis* ST13, possedevano due geni di resistenza, *blaBSU-1* e *vmlR*, che codificano le beta-lattamasi di classe D, le quali conferiscono resistenza ai beta-lattamici [79], e una proteina ATPasi di protezione ribosomiale che conferisce resistenza agli antibiotici streptogramina A e lincosamidi [80]. I quattro genomi *B. subtilis* ST47 ospitavano anche *vmlR* ma erano privi di *blaBSU-1*, mentre presentavano invece il gene *aadK*, che conferisce resistenza agli aminoglicosidi [81], e il gene *tetL*, che conferisce resistenza alla tetraciclina [82]. Tutti i geni AMR rilevati sono risultati intrinseci ai ceppi di *B. subtilis* (**Figura 2** e **Figura 3**).

Tutti i genomi di *B. velezensis* analizzati, compresi quelli del ceppo originale di *B. velezensis*, contenevano unicamente il gene *clbA*, che conferisce resistenza ad alcune classi di antibiotici, tra cui streptogramine, cloramfenicolo e clindamicina, attraverso la metilazione dell'rRNA 23S [83]. Non sono stati rilevati altri ARG in nessuno dei 45 genomi di *B. velezensis*.

Gli strumenti AMRFinderPlus v3.10.45 e ARIBA v2.14.4 hanno prodotto risultati diversi per quanto riguarda altri due geni di resistenza, *mphK*, che codifica la resistenza ai macrolidi attraverso l'espressione di una fosfotransferasi macrolidica [84], e *satA*, che codifica una streptotricina acetiltransferasi che conferisce resistenza all'antibiotico streptotricina [85]. Nello specifico, tutti i genomi di *B. subtilis* analizzati, incluso il ceppo originale di *B. subtilis* ST13, presentavano *mphK* secondo lo strumento AMRFinderPlus v3.10.45, ma un'analisi più attenta dei risultati ha rivelato che l'identità di corrispondenza era inferiore (80,72%) nel ceppo ST13 (102 genomi) e superiore (97,71%) nei quattro genomi appartenenti a ST47. D'altro canto, lo strumento ARIBA v2.14.4 ha rilevato un gene *mphK* completo solo nei quattro genomi ST47, con una corrispondenza di identità del 97,72%.

Per quanto riguarda *satA*, entrambi gli strumenti AMRFinderPlus v3.10.45 e ARIBA v2.14.4 hanno rilevato questo gene nei quattro genomi ST47 ma con identità corrispondenti diverse (rispettivamente il 90,17% e il 94,44% con i due strumenti), mentre nei genomi ST13, lo strumento AMRFinderPlus v3.10.45 non ha segnalato alcuna corrispondenza e lo strumento ARIBA v2.14.4 ha rilevato solo il gene *satA* assente, parziale o incompleto.

Gli stessi strumenti utilizzati con il database VFDB, AMRFinderPlus v3.10.45 e ARIBA v2.14.4, hanno consentito l'analisi dell'intero viruloma di tutti i genomi di *Bacillus* raccolti. I risultati non hanno evidenziato geni di virulenza con nessuno dei due strumenti, confermando l'assenza di fattori potenzialmente dannosi nei ceppi di *Bacillus* esaminati.

Allo stesso modo, la presenza di eventuali sequenze di repliconi plasmidici, potenzialmente portatrici di geni AMR o di virulenza, è stata valutata tramite Inctyper implementato in PathogenWatch e non sono state rilevate sequenze plasmidiche mobili in nessuno dei genomi analizzati.

Discussione

Il controllo della contaminazione microbica nell'ambiente sanitario è fondamentale per prevenire il rischio di contrarre ICA, le quali rappresentano una preoccupazione globale [3, 86]. I disinfettanti chimici sono stati utilizzati per decenni per ottenere tale controllo, ma nonostante la loro efficacia immediata, è stato riconosciuto che consentono una rapida ricontaminazione delle superfici igienizzate, portando in ultima analisi alla persistenza della contaminazione nell'ambiente ospedaliero [8]. Inoltre, hanno dimostrato un elevato impatto ambientale e di avere la capacità di favorire la selezione di ceppi tolleranti/resistenti ai disinfettanti e ai farmaci [5]. In linea con ciò, durante la pandemia di COVID-19, quando la

disinfezione chimica è stata significativamente aumentata sia in contesti sanitari che non sanitari, è stato registrato un aumento significativo dell'AMR [5, 10, 11, 21].

Nella ricerca di sistemi sostenibili in grado di fornire un controllo efficace della contaminazione e delle infezioni ospedaliere senza impattare sulla resistenza antimicrobica e sull'inquinamento, sono stati recentemente proposti sistemi basati sull'uso di probiotici come agenti di sanificazione (PBS) sulla base di studi che mostrano la capacità del PBS di fornire una diminuzione stabile di patogeni e della resistenza antimicrobica, accompagnata nella maggior parte dei casi da una significativa riduzione delle ICA [29, 33, 34, 37, 38, 87–92]. L'utilizzo dei probiotici in ambiente ospedaliero si basa sul fatto che sono considerati sicuri per gli esseri umani [41, 43], inoltre alcuni studi specifici sono stati condotti su uno di questi sistemi (Probiotic Cleaning Hygiene System, PCHS®), non segnalando effetti avversi o infezioni ospedaliere sostenute dai *Bacillus* derivanti dal PCHS nei pazienti ospedalizzati [32] e evidenziando la buona stabilità genetica dei PCHS-*Bacillus*, come confermato dall'assenza di ARG di nuova acquisizione nel tempo, mediante analisi microarray PCR [34, 35].

Tuttavia, non sono stati condotti studi per valutare in dettaglio le eventuali alterazioni genetiche dei probiotici *Bacillus* a seguito di un contatto prolungato con i patogeni ospedalieri circostanti. Trattandosi di microrganismi viventi che entrano in contatto con soggetti altamente suscettibili, abbiamo voluto indagare questo aspetto utilizzando un approccio metagenomico in grado di caratterizzare l'intero resistoma, viruloma e mobiloma prima e dopo l'applicazione sulle superfici ospedaliere.

A tal fine, sono stati analizzati tramite WGS 200 isolati di *Bacillus* raccolti da otto strutture sanitarie italiane (HS) in precedenti studi sull'applicazione del PCHS® tra gennaio 2015 e giugno 2017. Durante quel periodo di studio, il PCHS è stato applicato quotidianamente nei reparti di medicina generale di tutte le HS arruolate, in sostituzione della disinfezione chimica convenzionale. Sono stati raccolti campioni ambientali da 3 a 24 mesi dopo l'applicazione del PCHS e le singole colonie dei PCHS-*Bacillus* sono state isolate dopo il campionamento con piastre da contatto RODAC [34, 35]. Le singole colonie sono state identificate per la prima volta tramite PCR e sequenziamento dell'amplicone [35], consentendo l'identificazione di 172 colonie di *Bacillus* derivate dal detergente PCHS. Ogni isolato PCHS-*Bacillus* è stato poi analizzato mediante WGS per la conferma della specie e la caratterizzazione completa del genoma. Sono stati inclusi nell'analisi anche due ceppi isolati direttamente dal detergente PCHS originale.

Tra i 172 isolati, 149 hanno superato il controllo qualità dell'assemblaggio, insieme ai due genomi derivanti dal mix originale PCHS-*Bacillus*. L'assegnazione delle specie mediante

sequenziamento de novo ha rivelato la presenza di due specie, sia a livello ambientale che nel detergente originale, la prevalente *B. subtilis* (70,5%) e la minore *B. velezensis* (29,5%). In particolare, sebbene sia stata rilevata una terza specie, *B. megaterium*, anche sulla base dell'etichetta di composizione del prodotto, questa specie non è stata trovata mediante sequenziamento né nel detergente originale né nelle aree ospedaliere trattate. Ciò potrebbe essere dovuto alla difficoltà di isolare una specie che è probabilmente presente in una percentuale molto bassa rispetto agli altri due ceppi. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per comprendere se il *B. megaterium* fosse effettivamente presente nel prodotto al momento dello studio. È importante notare che gli isolati inizialmente classificati tramite PCR come *B.* pumilus [35] sono stati invece identificati come *B. velezensis*, grazie alla caratterizzazione più approfondita dei genomi ottenuta tramite sequenziamento de novo. Poiché *B. pumilus* e *B. velezensis* mostrano un grado molto elevato di omologia, come riportato negli studi riguardanti la riorganizzazione dell'albero filogenetico di *Bacillus* [93], questi risultati evidenziano l'importanza di utilizzare procedure di sequenziamento di nuova generazione per ottenere un'assegnazione tassonomica precisa delle specie di *Bacillus*.

Utilizzando tale procedura è stato anche possibile identificare differenze genetiche tra gli isolati delle due specie di *Bacillus*. Nello specifico, i genotipi di *B. subtilis* sono distinguibili in due cluster diversi: ST13, che rappresenta la maggior parte degli isolati (101/105, 96,2%), e ST47, che rappresenta la percentuale minore (4/105, 3,8%). Allo stesso modo, gli isolati di *B. velezensis* sono stati divisi in un gruppo principale (34/44, 77,3%) e un gruppo minore (10/44, 22,7%). La presenza di diversi sottogruppi di isolati PCHS-*Bacillus*, sebbene non prevista, potrebbe essere attribuibile alla loro presenza simultanea nella miscela originale, il che sarebbe compatibile con l'elevato grado di omologia dei sottoceppi nelle due specie di *Bacillus* selezionate. Sebbene questa ipotesi non sia stata esplicitamente testata, i ceppi originali derivanti direttamente dal detergente sembrano supportare tale supposizione, poiché risultano appartenere entrambi al gruppo più rappresentato delle due specie, *B. subtilis* ST13 e *B. velezensis* (gruppo principale).

L'analisi degli SNP non ha rivelato differenze nei genomi appartenenti né nel cluster minore di *B. subtilis* ST47 (0 SNP) né in nessuno dei due cluster di *B. velezensis* (0 SNP). Invece, i 102 genomi classificati come *B. subtilis* ST13 (incluso il ceppo PCHS originale) differivano tra loro per una media di 1 SNP (intervallo 0−2). Identificando i loci contenenti SNP, sono state trovate cinque posizioni variabili in un totale di 23 genomi *B. subtilis* ST13 isolati da diverse HS, il che suggerisce che erano probabilmente presenti nella miscela originale piuttosto che rappresentare mutazioni verificatesi all'interno degli ospedali stessi. Una mutazione è stata

rilevata in una regione intergenica, mentre le altre si sono verificate in regioni codificanti. Tra queste, le mutazioni nel gene *AN935_00110* e nel gene *AN935_03395* sono sostituzioni non sinonime, le quali potrebbero potenzialmente determinare un'alterazione della struttura della proteina prodotta, compromettendone la funzione. Poiché il gene *AN935_00110* codifica la proteina xpaC, una proteina con attività idrolasica, questa mutazione potrebbe influenzare diverse attività, incluso il processo di sporulazione [94]. Il gene *AN935_03395* codifica invece l'elicasi PcrA del DNA ATP-dipendente, un'elicasi batterica specifica che appartiene alla famiglia delle elicasi UvrD/Rep con doppia attività, traslocazione del ssDNA e destabilizzazione dei duplex; la sua mutazione potrebbe quindi potenzialmente portare ad una perdita di funzione proteica, con un'incapacità di idrolizzare l'ATP e quindi di apportare cambiamenti conformazionali essenziali per il legame al ssDNA [95]. La validazione sperimentale consentirebbe di rafforzare queste ipotesi.

Considerando il periodo di raccolta dei campioni e i tassi di mutazione naturale di *Bacillus* [96, 97], ci si aspettava l'assenza di una variabilità genetica sostanziale tra i genomi appartenenti allo stesso cluster. I risultati hanno inoltre suggerito che i cluster evidenziati rappresentavano due sottogruppi diversi appartenenti alla stessa specie batterica, piuttosto che mutazioni progressive avvenute nel tempo all'interno di ciascuna specie.

La ricerca di ARG nei genomi analizzati, eseguita con due strumenti diversi (AMRFinderPlus e ARIBA), ha rivelato la presenza dei geni *blaBSU-1*, *vmlR*, *aadK* e *tetL* nei genomi di *B. subtilis*, rivelando che questa specie può essere resistente ai beta-lattamici, alla streptogramina A/lincosamide, agli aminoglicosidi e alla tetraciclina [79, 80, 83, 84]. Per quanto riguarda invece i genomi di *B. velezensis*, è stato scoperto che tutti contengono un ARG intrinseco unico, il gene *clbA*, che conferisce resistenza alla streptogramina, al cloramfenicolo e alla clindamicina [83]. Altri due ARG sono stati rilevati con diversa efficienza dagli strumenti AMRFinderPlus v3.10.45 e ARIBA v2.14.4 nei genomi analizzati: *mphK*, che codifica la resistenza ai macrolidi [84], e *satA*, che conferisce resistenza alla streptotricina [85]. Il gene *mphK* è stato rilevato in tutti i genomi di *B. subtilis*, compreso il ceppo originale PCHS-*Bacillus subtilis*, mentre solo ARIBA ha rilevato i geni *mphK* e *satA* nel gruppo ST47. La differenza potrebbe essere dovuta alle diverse versioni del database utilizzate dai due strumenti, poiché lo strumento AMRFinderPlus v3.10.45 è stato utilizzato con la versione del database 2022-10-11.2, mentre lo strumento ARIBA v2.14.4 è stato utilizzato con la versione 2022-01-31. Questo, insieme ai diversi input utilizzati per l'analisi, potrebbe spiegare le differenze osservate per i geni *mphK* e satA. In ogni caso, tutti gli ARG rilevati erano intrinseci a *Bacillus* [98, 99], localizzati sul cromosoma batterico e non sui plasmidi mobili, suggerendo che non potevano

essere facilmente trasferiti ad altri batteri tramite trasferimento genico orizzontale (HGT). Ancora più importante, i risultati hanno rivelato la presenza degli stessi ARG rilevati nei ceppi originali in tutti gli isolati ospedalieri di *Bacillus*, supportando la conclusione che i ceppi PCHS-*Bacillus* isolati dagli ambienti trattati non avevano acquisito nuovi ARG da altri batteri circostanti presenti sulle superfici ospedaliere.

Allo stesso modo, sono stati analizzati sia i ceppi originali di PCHS-*Bacillus* sia gli isolati di *Bacillus* per verificare la presenza di geni di virulenza. Il database VFDB utilizzato include diversi fattori di virulenza che possono essere trovati sia nella specie *B. subtilis* che in quella *B. velezensis*, come *capBCA* (che codifica enzimi associati alla membrana che facilitano l'invasione sistemica) e l'emolisina A (*hlyA*, una tossina formante pori che possiede attività emolitiche, citotossiche, dermonecrotiche e di permeabilità vascolare) [100, 101]. I risultati hanno rivelato l'assenza di questi e di altri geni di virulenza in tutti i genomi analizzati, confermando così l'assenza di potenziale patogeno delle specie PCHS-*Bacillus* di per sé, nonché l'assenza di nuovi geni di virulenza acquisiti dai patogeni circostanti.

Infine, poiché la presenza di plasmidi mobili è associata all'AMR e alla capacità generale di mobilitare e scambiare materiale genetico tra cellule batteriche [68, 102], sono stati analizzati per questo aspetto sia i PCHS-*Bacillus* originali che quelli isolati. Da notare che i plasmidi sono stati evidenziati in altri ceppi di *B. subtilis* [103], il che dimostra la presenza di differenze tra ceppi di *Bacillus* anche all'interno di una singola specie, e la conseguente necessità di controllare attentamente ogni ceppo destinato a scopi igienico-sanitari poiché i risultati relativi ad alcuni ceppi non sono generalizzabili all'intera specie. I risultati ottenuti da PlasmidFinder non hanno evidenziato alcuna sequenza plasmidica in nessuna delle sequenze di *Bacillus* analizzate, confermando che l'HGT potrebbe essere improbabile nei ceppi PCHS-*Bacillus*. In effetti, l'HGT in *Bacillus* può verificarsi anche attraverso altri meccanismi, compresi i processi mediati dalla trasformazione [96, 104, 105]. Tuttavia, l'assenza di nuovi geni di resistenza/virulenza acquisiti nella totalità degli isolati PCHS-*Bacillus*, nonostante il loro continuo contatto con agenti patogeni, supporta la conclusione che gli eventi HGT sono improbabili su superfici colonizzate, sebbene l'HGT interspecie sia stato segnalato in ambienti naturali [106].

Uno dei limiti del nostro studio è legato alla dimensione del pool di campioni, che potrebbe essere ampliato e includere campioni provenienti da contesti sanitari e non sanitari diversi o da paesi diversi, al fine di fornire prove più solide. Inoltre, la durata dello studio di circa due anni potrebbe non essere sufficiente per escludere possibili cambiamenti a lungo termine nei *Bacillus*. Studi simili condotti in ambienti sanitari fornirebbero un contesto prezioso, che oggi

manca. Pertanto, eseguire analisi su un periodo di tempo più lungo può essere utile per confermare la loro sicurezza a lungo termine. Inoltre, sarebbe importante monitorare regolarmente il contenuto genetico dei *Bacillus* (in particolare quando utilizzati in ambienti sanitari ad alto rischio) per escludere qualsiasi possibile variazione che potrebbe verificarsi a seguito del contatto con agenti patogeni MDR. Un altro limite importante del nostro studio riguarda la solidità delle conclusioni filogenetiche, che dovrebbero essere supportate dall'analisi dei gruppi esterni, assenti nelle nostre analisi. Sono inoltre necessari studi longitudinali, che includano diversi contesti, condizioni ambientali e applicazioni in aree non ospedaliere, per approfondire le conoscenze e spianare la strada all'uso sicuro ed efficace dei *Bacillus* in molti campi.

Inoltre, potrebbe essere interessante ripetere le analisi utilizzando diversi strumenti bioinformatici e uno strumento per l'analisi pan-genomica per verificare la presenza di altri eventuali geni, non codificanti fattori di resistenza o virulenza, per escludere l'acquisizione di qualsiasi tipo di sequenza.

Conclusioni

In conclusione, per la prima volta, l'analisi WGS approfondita ha fornito una caratterizzazione completa delle specie di *Bacillus* utilizzate per scopi igienico-sanitari in un sistema PBS (PCHS®), supportando la loro elevata stabilità genetica e l'assenza di geni potenzialmente pericolosi sia nei genomi PCHS-*Bacillus* originali sia in quelli ottenuti dalle superfici dopo un contatto prolungato con i patogeni ospedalieri circostanti. Data l'assenza di ARG di nuova acquisizione, geni di virulenza o sequenze plasmidiche in qualsiasi isolato PCHS-*Bacillus*, questi dati supportano la sicurezza del loro utilizzo in ambito sanitario, evidenziando ulteriormente il loro potenziale utilizzo in ogni ambiente comunitario o persino nelle aziende agricole per ridurre il rischio infettivo e la diffusione dell'AMR in una prospettiva "One Health". Sarebbero auspicabili ulteriori studi approfonditi su altri ceppi di *Bacillus* utilizzati per scopi e indicazioni simili.

Dichiarazioni

Approvazione etica e consenso alla partecipazione

Non applicabile.

Consenso per la pubblicazione

Non applicabile.

Disponibilità di dati e materiali

I set di dati generati e/o analizzati durante lo studio attuale sono disponibili e visualizzabili all'URL https://microreact.org/project/bacillusseqproject.

Conflitti di interesse

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Finanziamento: lo studio ha ricevuto il sostegno senza restrizioni della Melinda & Bill Gates Foundation (ID investimento INV-004891).

Contributi degli autori: concettualizzazione, EC; metodologia, FB, JDC, SD, SA, DA; software, FB, JDC, SD, SA; convalida, IS, NDA, JDC, SD, SA; analisi formale, FB, EC, SD; indagine, FB, IS, MDA, AV, MB; risorse, DA, EC; cura dei dati, SM, SD, EC; stesura-preparazione della bozza originale, FB, IS, EC; stesura-revisione e modifica, SD, EC; visualizzazione, SM; supervisione, DA, EC; amministrazione del progetto, DA; acquisizione dei finanziamenti, DA, EC. Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

Ringraziamenti: Vorremmo ringraziare la Dott.ssa Padmini Srikantiah (Melinda & Bill Gates Foundation) per il suo essenziale supporto e il suo contributo fondamentale.

Bibliografia

1. Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. Journal of Hospital Infection. 2009;73:378–85.

2. Dancer SJ. Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination. Clin Microbiol Rev. 2014;27:665–90.

3. ECDC. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. 2022-2023. ECDC. 2024. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/PPS-HAI-AMR-acute-care-europe-2022-2023.pdf. Accessed 29 Jun 2024.

4. Cassini A, Plachouras D, Eckmanns T, Abu Sin M, Blank H-P, Ducomble T, et al. Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability-Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study. PLoS Med. 2016;13:e1002150.
5. Ghafoor D, Khan Z, Khan A, Ualiyeva D, Zaman N. Excessive use of disinfectants against COVID-19 posing a potential threat to living beings. Curr Res Toxicol. 2021;2:159–68.
6. Nabi G, Wang Y, Hao Y, Khan S, Wu Y, Li D. Massive use of disinfectants against COVID-19 poses potential risks to urban wildlife. Environ Res. 2020;188:109916.
7. 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:e108598.
8. D'Accolti M, Soffritti I, Bonfante F, Ricciardi W, Mazzacane S, Caselli E. Potential of an eco-sustainable probiotic-cleaning formulation in reducing infectivity of enveloped viruses. Viruses. 2021;13.
9. Kampf G. Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. Antibiotics. 2018;7:110.
10. Lai C-C, Chen S-Y, Ko W-C, Hsueh P-R. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. Int J Antimicrob Agents. 2021;57:106324.
11. Clancy CJ, Buehrle DJ, Nguyen MH. PRO: The COVID-19 pandemic will result in increased antimicrobial resistance rates. JAC Antimicrob Resist. 2020;2.
12. ECDC EC for DP and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012. 2013. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/eb/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf. Accessed 29 Jun 2024.
13. ECDC. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2020. Ecdc. 2020;1244:1–71.
14. OECD. Antimicrobial resistance tackling the burden in the european union. https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Tackling-the-Burden-in-the-EU-OECD-ECDC-Briefing-Note-2019.pdf.
15. ECDC. Surveillance of healthcare-associated infections and prevention indicators in european intensive care units. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/HAI-Net-ICU-protocol-v2.2_0.pdf. Accessed 3 Jul 2024.
16. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates to Chlorhexidine. Antimicrob Agents Chemother. 2016;61.

17. Xia H, Horn J, Piotrowska MJ, Sakowski K, Karch A, Kretzschmar M, et al. Regional patient transfer patterns matter for the spread of hospital-acquired pathogens. Sci Rep. 2024;14:929.
18. Piotrowska MJ, Sakowski K, Karch A, Tahir H, Horn J, Kretzschmar ME, et al. Modelling pathogen spread in a healthcare network: Indirect patient movements. PLoS Comput Biol. 2020;16:e1008442.
19. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. J Glob Antimicrob Resist. 2021;27:101–11.
20. D'Accolti M, Soffritti I, Bini F, Mazziga E, Cason C, Comar M, et al. Shaping the subway microbiome through probiotic-based sanitation during the COVID-19 emergency: a pre–post case–control study. Microbiome. 2023;11:1–19.
21. Getahun H, Smith I, Trivedi K, Paulin S, Balkhy HH. Tackling antimicrobial resistance in the COVID-19 pandemic. Bull World Health Organ. 2020;98:442-442A.
22. O'Neill J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance. 2016; December:1–16.
23. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. Nat Microbiol. 2019;4:1432–42.
24. Marimuthu K, Pittet D, Harbarth S. The effect of improved hand hygiene on nosocomial MRSA control. Antimicrob Resist Infect Control. 2014;3:1–6.
25. WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. https://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/global-action-plan.html.
26. WHO. One Health. https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1. Accessed 24 Feb 2025.
27. Cason C, D'Accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Comar M, Caselli E. Next-generation sequencing and PCR technologies in monitoring the hospital microbiome and its drug resistance. Front Microbiol. 2022;13 July:1–10.
28. Caselli E, D'Accolti M, Soffritti I, Lanzoni L, Bisi M, Volta A, et al. An Innovative Strategy for the Effective Reduction of MDR Pathogens from the Nosocomial Environment. 2019.
29. D'accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Caselli E. Fighting amr in the healthcare environment: Microbiome-based sanitation approaches and monitoring tools. Int J Mol Sci. 2019;20.

30. D’accolti M, Soffritti I, Bini F, Mazziga E, Mazzacane S, Caselli E. Pathogen Control in the Built Environment: A Probiotic-Based System as a Remedy for the Spread of Antibiotic Resistance. Microorganisms. 2022;10.
31. Caselli E. Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings. Microb Biotechnol. 2017;10.
32. Caselli E, Antonioli P, Mazzacane S. Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation. Journal of Hospital Infection. 2016;94.
33. Caselli E, Arnoldo L, Rognoni C, D’Accolti M, Soffritti I, Lanzoni L, et al. Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: A multicenter study. Infect Drug Resist. 2019;12.
34. Caselli E, Brusaferro S, Coccagna M, Arnoldo L, Berloco F, Antonioli P, et al. Reducing healthcare-associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: A multicentre, prospective, intervention study. PLoS One. 2018;13.
35. Caselli E, D’Accolti M, Vandini A, Lanzoni L, Camerada MT, Coccagna M, 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.
36. Soffritti I, D’Accolti M, Cason C, Lanzoni L, Bisi M, Volta A, et al. Introduction of Probiotic-Based Sanitation in the Emergency Ward of a Children’s Hospital During the COVID-19 Pandemic. Infect Drug Resist. 2022;15:1399–410.
37. Neidhöfer C, Rathore K, Parčina M, Sieber MA. ESKAPEE Pathogen Biofilm Control on Surfaces with Probiotic Lactobacillaceae and Bacillus species. Antibiotics. 2023;12:871.
38. Leistner R, Kohlmorgen B, Brodzinski A, Schwab F, Lemke E, Zakonsky G, et al. Environmental cleaning to prevent hospital-acquired infections on non-intensive care units: a pragmatic, single-centre, cluster randomized controlled, crossover trial comparing soap-based, disinfection and probiotic cleaning. EClinicalMedicine. 2023;59:101958.
39. Koch-Institut. Anforderungen an die Hygiene bei der Reinigung und Desinfektion von Flächen. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2022;65:1074–115.
40. FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS). https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras.
41. EFSA. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. EFSA Journal. 2020;18.

42. EFSA. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2005.226.
43. EFSA BIOHAZ Panel. Statement on the update of the list of qps-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until september 2021. https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2022.7045.
44. Lee N-K, Kim W-S, Paik H-D. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. Food Sci Biotechnol. 2019;28:1297–305.
45. Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. Front Microbiol. 2017;8.
46. Golnari M, Bahrami N, Milanian Z, Rabbani Khorasgani M, Asadollahi MA, Shafiei R, et al. Isolation and characterization of novel Bacillus strains with superior probiotic potential: comparative analysis and safety evaluation. Sci Rep. 2024;14:1457.
47. Di Tommaso P, Chatzou M, Floden EW, Barja PP, Palumbo E, Notredame C. Nextflow enables reproducible computational workflows. Nat Biotechnol. 2017;35:316–9.
48. Underwood A. Assembly and QC pipeline. https://gitlab.com/cgps/ghru/pipelines/dsl2/pipelines/assembly. Accessed 10 Oct 2022.
49. GHRU. Retrospective 1 bioinformatics methods v.4. https://www.protocols.io/view/ghru-genomic-surveillance-of-antimicrobial-resista-bp2l6b11kgqe.
50. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. Genome Biol. 2016;17:132.
51. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30:2114–20.
52. Andrews S. Fastqc. https://github.com/s-andrews/FastQC.
53. Underwood A. Bactinspector. https://gitlab.com/antunderwood/bactinspector. Accessed 30 Oct 2022.
54. Low AJ, Koziol AG, Manninger PA, Blais B, Carrillo CD. ConFindr: rapid detection of intraspecies and cross-species contamination in bacterial whole-genome sequence data. PeerJ. 2019;7:e6995.
55. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012;19:455–77.

56. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 2013;29:1072–5.
57. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics. 2016;32:3047–8.
58. Underwood A. Qualifyr. https://gitlab.com/cgps/qualifyr. Accessed 20 Oct 2022.
59. Argimón C. A.; Goater R. J.; Abudahab K.; Taylor B.; Underwood A.; Sánchez-Busó L.; Wong V. K.; Dyson Z. A.; Nair S.; Park S. E.; Marks F.; Page A. J.; Keane J. A.; Baker S; Holt K. E.; Dougan G.; Aanensen D. M. S; Y. A global resource for genomic predictions of antimicrobial resistance and surveillance of Salmonella Typhi at pathogenwatch. Nat Commun. 2021;12(1):2879.
60. Underwood A. SNP phylogeny pipeline. https://gitlab.com/cgps/ghru/pipelines/snp_phylogeny. Accessed 20 Oct 2022.
61. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. ArXiv. 2013. https://doi.org/10.48550/arXiv.1303.3997.
62. NCBI. Sequence. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP013984.1. Accessed 20 Oct 2022.
63. NCBI. Sequence. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NZ_CP085505.1. Accessed 3 Nov 2022.
64. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009;25:2078–9.
65. Page AJ, Taylor B, Delaney AJ, Soares J, Seemann T, Keane JA, et al. SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. Microb Genom. 2016;2.
66. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol. 2020;37:1530–4.
67. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:3895–903.
68. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2018;73:1121–37.
69. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. Sci Rep. 2021;11:12728.

70. Hunt M, Mather AE, Sánchez-Busó L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, et al. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. Microb Genom. 2017;3.
71. Underwood A. AMR prediction pipeline. https://gitlab.com/cgps/ghru/pipelines/dsl2/pipelines/amr_prediction. Accessed 30 Oct 2022.
72. Suzuki H. VFDB. https://github.com/haruosuz/vfdb. Accessed 30 Oct 2022.
73. Tonkin-Hill G. PairSNP. https://github.com/gtonkinhill/pairsnp. Accessed 30 Oct 2022.
74. Nagaraj G, Shamanna V, Govindan V, Rose S, Sravani D, Akshata KP, et al. High-Resolution Genomic Profiling of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates: A Multicentric Retrospective Indian Study. Clinical Infectious Diseases. 2021;73 Supplement_4:S300–7.
75. Sauerborn E, Corredor NC, Reska T, Perlas A, Vargas da Fonseca Atum S, Goldman N, et al. Detection of hidden antibiotic resistance through real-time genomics. Nat Commun. 2024;15:5494.
76. CGPS. Data-flo. https://data-flo.io/. Accessed 22 Nov 2022.
77. Argimón S, Abudahab K, Goater RJE, Fedosejev A, Bhai J, Glasner C, et al. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. Microb Genom. 2016;2.
78. D'Accolti M, Soffritti I, Bini F, Mazziga E, Arnoldo L, Volta A, et al. Potential Use of a Combined Bacteriophage–Probiotic Sanitation System to Control Microbial Contamination and AMR in Healthcare Settings: A Pre-Post Intervention Study. Int J Mol Sci. 2023;24.
79. Alcock BP, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. Nucleic Acids Res. 2023;51:D690–9.
80. Obana N, Takada H, Crowe-McAuliffe C, Iwamoto M, Egorov AA, Wu KJY, et al. Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: VmlR2, Ard1 and CplR. Nucleic Acids Res. 2023;51:4536–54.
81. Noguchi N, Sasatsu M, Kono M. Genetic mapping in Bacillus subtilis 168 of the aadK gene which encodes aminoglycoside 6-adenylyltransferase. FEMS Microbiol Lett. 1993;114:47–52.
82. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Lett. 2005;245:195–203.
83. Hansen LH, Planellas MH, Long KS, Vester B. The order Bacillales hosts functional homologs of the worrisome cfr antibiotic resistance gene. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:3563–7.

84. Pawlowski AC, Stogios PJ, Koteva K, Skarina T, Evdokimova E, Savchenko A, et al. The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. Nat Commun. 2018;9:112.
85. Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, et al. The genome sequence of Bacillus anthracis Ames and comparison to closely related bacteria. Nature. 2003;423:81–6.
86. Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, Owens SM, Handley KM, Scott NM, et al. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. Science. 2014;345:1048–52.
87. Fauci V La. An Innovative Approach to Hospital Sanitization Using Probiotics: In Vitro and Field Trials. J Microb Biochem Technol. 2015;07.
88. Afinogenova AG, Kraeva LA, Afinogenov GE, Veretennikov V V. PROBIOTIC-BASED SANITATION AS ALTERNATIVES TO CHEMICAL DISINFECTANTS. Russian Journal of Infection and Immunity. 2018;7:419–24.
89. Kleintjes WG, Prag R, Ebrahim M, Kotzee EP. The effect of probiotics for environmental cleaning on hospital-acquired infection in a burn centre: The results of a non-randomised controlled prospective study. South African Journal of Plastic & Reconstructive Aesthetic Surgery & Burns. 2020;3:33.
90. Al-Marzooq F, Bayat S Al, Sayyar F, Ishaq H, Nasralla H, Koutaich R, et al. Can probiotic cleaning solutions replace chemical disinfectants in dental clinics? Eur J Dent. 2018;12:532–9.
91. Al Marzooq F, Al Kawas S, Al Bayat S, Sayyar F, Ishaq H, Nasralla H, et al. Infection Control in The Dental Clinics: Probiotic-Based Cleaning as an Alternative to Chemical Disinfection. J Infect Public Health. 2019;12:128.
92. Klassert TE, Zubiria-Barrera C, Neubert R, Stock M, Schneegans A, López M, et al. Comparative analysis of surface sanitization protocols on the bacterial community structures in the hospital environment. Clinical Microbiology and Infection. 2022;28:1105–12.
93. Rabbee MF, Ali MdS, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek K. Bacillus velezensis: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. Molecules. 2019;24:1046.
94. Decatur A, Losick R. Identification of additional genes under the control of the transcription factor sigma F of Bacillus subtilis. J Bacteriol. 1996;178:5039–41.

95. Dillingham MS, Soultanas P, Wigley DB. Site-directed mutagenesis of motif III in PcrA helicase reveals a role in coupling ATP hydrolysis to strand separation. Nucleic Acids Res. 1999;27:3310–7.
96. Slomka S, Françoise I, Hornung G, Asraf O, Biniashvili T, Pilpel Y, et al. Experimental Evolution of Bacillus subtilis Reveals the Evolutionary Dynamics of Horizontal Gene Transfer and Suggests Adaptive and Neutral Effects. Genetics. 2020;216:543–58.
97. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of Spontaneous Mutation. Genetics. 1998;148:1667–86.
98. Wash P, Batool A, Mulk S, Nazir S, Yasmin H, Mumtaz S, et al. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Respective Genes among Bacillus spp., a Versatile Bio-Fungicide. Int J Environ Res Public Health. 2022;19:14997.
99. Brutscher LM, Gebrechristos S, Garvey SM, Spears JL. Genetic and Phenotypic Characterization of Bacillus velezensis Strain BV379 for Human Probiotic Applications. Microorganisms. 2024;12:436.
100. Gu H-J, Sun Q-L, Luo J-C, Zhang J, Sun L. A First Study of the Virulence Potential of a Bacillus subtilis Isolate From Deep-Sea Hydrothermal Vent. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9.
101. Chen B, Zhou Y, Duan L, Gong X, Liu X, Pan K, et al. Complete genome analysis of Bacillus velezensis TS5 and its potential as a probiotic strain in mice. Front Microbiol. 2023;14.
102. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:2227–38.
103. Tanaka T, Koshikawa T. Isolation and characterization of four types of plasmids from Bacillus subtilis (natto). J Bacteriol. 1977;131:699–701.
104. Danevčič T, Dragoš A, Spacapan M, Stefanic P, Dogsa I, Mandic-Mulec I. Surfactin Facilitates Horizontal Gene Transfer in Bacillus subtilis. Front Microbiol. 2021;12.
105. Stefanic P, Belcijan K, Kraigher B, Kostanjšek R, Nesme J, Madsen JS, et al. Kin discrimination promotes horizontal gene transfer between unrelated strains in Bacillus subtilis. Nat Commun. 2021;12:3457.
106. Dahlberg C, Bergstrom M, Andreasen M, Christensen BB, Molin S, Hermansson M. Interspecies Bacterial Comjugation by Plasmids from Marine Environments Visualized by gfp Expression. Mol Biol Evol. 1998;15:385–90.