

L'OSPEDALE



La sanificazione delle degenze ospedaliere: nuove strategie per la riduzione delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria

Riassunto

Nella memoria viene affrontato il tema della sanificazione di degenze ospedaliere e delle criticità insite nelle tecniche di comune utilizzo per la pulizia delle superfici e degli arredi. Le modalità con cui queste vengono effettuate hanno una diretta attinenza con le infezioni correlate all'assistenza sanitaria (HAI).

Grazie ai risultati di ricerche sperimentali condotte negli anni 2010-2013 in alcuni Ospedali italiani e nell'Ospedale di Lokeren (Belgio), viene proposto un nuovo protocollo di intervento, che prevede l'impiego di un prodotto sanificante probiotico, contenente *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium* sotto forma vegetativa e sporigena.

Questi batteri sono in grado di colonizzare le superfici su cui vengono applicati, contrastando la proliferazione delle altre specie batteriche e/o fungine potenzialmente patogene (legge di Gause), grazie ad una azione di esclusione competitiva. Lo studio ha permesso di verificare, sotto il profilo qualitativo e quantitativo, sia *in vitro* che *in situ*, l'azione di tali prodotti rispetto all'impiego di trattamenti tradizionali a base di disinfettanti chimici. I risultati ottenuti dimostrano che con le nuove metodologie si ottiene una riduzione della carica di *Stafilococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, coliformi (compreso *Escherichia Coli*), *Candida albicans* e *Acinetobacter spp.* di oltre l'80 % rispetto ai valori ottenibili mediante protocolli tradizionali di disinfezione chimica. Inoltre, mentre in quest'ultimo caso si verificano, nell'arco delle 24 ore, oscillazioni molto elevate della carica batterica superficiale potenzialmente patogena, i prodotti probiotici (PIP) garantiscono un valore più costante, oltre che più ridotto, del numero delle UFC (Unità Formanti Colonie) dei medesimi microrganismi, indipendentemente dalla entità dei fenomeni di ricontaminazione imputabili alla presenza di individui.

In tal modo è possibile introdurre il concetto di *bio-stabilizzazione* nel tempo del livello di igiene delle superfici.

I risultati ottenuti hanno suggerito nuovi scenari di valutazione della efficacia delle procedure di pulizia di degenze ospedaliere, che può essere quindi effettuata in termini di misurazione delle UFC/m² di uno specifico patogeno, indipendentemente dal protocollo adottato e dal prodotto di impiego. Si è quindi giunti alla costruzione di una scala di misura, denominata "Scala degli Indici di Qualità Microbica (IMQ)", di cui si propone l'adozione, che rappresenta uno strumento oggettivo per la stima quantitativa della contaminazione delle superfici delle degenze ospedaliere, in quanto effetto finale di un trattamento di sanificazione. Di conseguenza, alla luce dei risultati di circa 30.000 campionamenti *in situ*, è stato possibile anche individuare il valore di IMQ ottenibile con procedure di pulizia con prodotti probiotici. L'efficacia di un generico processo di sanificazione può quindi essere misurata e valutata oggettivamente.

Un ulteriore aspetto è relativo alla sicurezza dei batteri probiotici nei confronti della salute umana. Nonostante i dati disponibili ad oggi in letteratura siano del tutto rassicuranti a questo proposito, sono state ugualmente adottate procedure di verifica della sensibilità all'azione dei comuni antibiotici dei microorganismi *Bacillus spp.* presenti sulle superfici sanificate. Tutti gli antibiogrammi effettuati in campo hanno confermato l'assenza di alcun genere di resistenza. Tale procedura viene integrata con test di tipo molecolare (*plasmid curing*) mediante analisi PCR, per accertare eventuali acquisizioni di caratteri di virulenza e/o resistenza non compresi negli antibiogrammi di routine. La nuova strategia di sanificazione proposta, P.C.H.S. Probiotic Cleaning Hygien System, determina inoltre dirette ricadute economiche, con risparmi di circa il 5-15 % rispetto alle tradizionali tecniche di disinfezione chimica. Le ricerche effettuate hanno infine permesso di ridefinire in termini concettuali il tema dell'igiene ospedaliera. Ne consegue quindi la necessità di un salto culturale da parte degli operatori del settore, con un approccio non più centrato in via esclusiva sul particolare prodotto o protocollo sanificante utilizzato, ma su una più chiara esplicitazione di quell'insieme di tecniche e metodiche comportamentali, di formazione ed educazione del personale sanitario e di pulizia, di verifica sistematica dei risultati, tali da costituire un sistema integrato di interventi, che, nella proposta qui avanzata, è denominato "*sistema PCHS*" (Probiotic Cleaning Hygien System).

Sante Mazzacane*, Gianfranco Finzi****, Luigi Aparo*****, Pier Giorgio Balboni*, Alberta Vandini*, Paola Antonioli**, Luca Lanzoni*, Maria Teresa Camerada*, Maddalena Coccagna*, Alessio Branchini***, Daniela Platano***

*CIAS, Centro ricerche Inquinamento Ambientali Alta Sterilità, Dipartimento di Architettura, Università degli Studi di Ferrara

**Azienda Ospedaliero Universitaria Sant'Anna di Ferrara, Dipartimento di Controllo e Prevenzione Infezioni - Risk Management

***Dipartimento Scienze della Vita e Biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara

****Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna

*****Presidente Nazionale ANMDO

*****Segretario Scientifico Nazionale ANMDO

INTRODUZIONE

Le procedure di sanificazione hanno il precipuo scopo di ridurre e contenere la proliferazione dei microorganismi presenti negli ambienti ospedalieri.

Le infezioni nosocomiali (ICA) sono una delle complicità più frequenti che possono verificarsi in strutture sanitarie. Il 5% -15% di tutti i pazienti ricoverati in ospedale possono sviluppare almeno una ICA durante il ricovero [1].

Tre studi condotti in Italia hanno mostrato una frequenza del 6,7% delle ICA [2], con prevalenza delle infezioni del tratto respiratorio inferiore seguite da infezioni del tratto urinario. Nel 1998, il Piano Sanitario Nazionale italiano ha identificato la riduzione delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria come una priorità [3].

Una delle questioni più controverse e dibattute è il ruolo qualitativo e quantitativo del contesto ambientale nel processo di contaminazione del paziente, in particolare il ruolo delle superfici di confinamento e di arredo. Infatti, è noto che queste superfici agiscono come *reservoirs* [4] per i microorganismi, aumentando il rischio di contaminazione incrociata attraverso il contatto diretto e/o indiretto con il paziente.

Per questo motivo vengono effettuate procedure di igienizzazione di tutti gli arredi e gli oggetti che interagiscono con gli individui.

Comunemente, tali tecniche fanno uso di disinfettanti chimici, con i conseguenti rischi per l'inquinamento ambientale e per la sicurezza degli utenti, e con notevoli criticità di risultato [5].

Diversi sono i fattori che determinano l'efficacia biocida di un disinfettante chimico: il tempo di contatto, la concentrazione, la temperatura, il pH, la presenza di materiale organico e il tipo di microorganismo e ciò viene sottolineato per sfatare il mito secondo cui è

PAROLE CHIAVE:

Contaminazione, disinfettanti chimici, probiotici, sanificazione, degenze ospedaliere

possibile impiegare un qualunque prodotto disinfettante per igienizzare una qualunque superficie.

Pertanto le procedure di sanificazione effettuate mediante l'impiego di disinfettanti chimici presentano diversi svantaggi, riconducibili:

- alla limitata efficacia biocida nel tempo, che normalmente si esaurisce nell'arco di 20-30 minuti dopo l'applicazione, con successiva crescita esponenziale degli agenti microbiologici; ciò è imputabile anche al fatto che l'azione del disinfettante determina produzione di materiale organico da decomposizione, quindi nutrizionale, che favorisce la proliferazione dei microorganismi;

- alla diversa efficacia del disinfettante in funzione delle caratteristiche fisico - chimiche del supporto trattato;

- alla capacità, da parte dei microorganismi stessi, di sviluppare continue mutazioni genetiche e difese di diverso genere, atte a rendere inefficace l'azione biocida chimica, con i conseguenti fenomeni di biocida resistenza, ben descritti in letteratura;

- ai problemi allergenici e di inquinamento dell'ambiente naturale generati dall'uso massivo di sostanze chimiche che possono accumularsi in modo persistente nei grandi serbatoi naturali (suolo, acqua, aria).

Tutto ciò ha peraltro determinato un processo di selezione naturale dei ceppi microbici patogeni, sempre più resistenti alle comuni tecniche di disinfezione.

Recenti ricerche sperimentali hanno individuato la possibilità di utilizzare nuove metodologie di sanificazione [6] [7], che sfruttano il "*principio della competizione biologica*", utilizzando prodotti probiotici (PIP) - costituiti da *Ba-*

cillus subtilis, *Bacillus megaterium* e *Bacillus pumilus* sotto forma vegetativa e sporigena - con carica microbica non patogena, in grado di colonizzare le superfici su cui vengono applicati, contrastando la proliferazione delle altre specie batteriche in base al principio della esclusione competitiva (legge di Gause, 1934).

Tale principio consiste nel fatto che due diverse specie (batteriche e/o fungine), che insistono sullo stesso microcosmo ecologico, non possono coesistere in equilibrio stabile se fanno riferimento agli stessi substrati nutritivi, ma una delle due, normalmente la meno esigente per fattori nutrizionali, diventerà predominante rispetto all'altra, potendone causare anche l'estinzione. Da un punto di vista microbiologico per le superfici trattate con prodotti probiotici il biofilm esistente viene di fatto sostituito da un nuovo tipo di biofilm, in prevalenza formato dai nuovi microorganismi immessi artificialmente con i prodotti di pulizia. Queste procedure possono essere quindi connotate come "*tecniche di biostabilizzazione*" di una specie rispetto ad un'altra, non implicando pertanto un'azione biocida generalizzata, se non come effetto finale nei confronti di determinate specie microbiche. La recente disponibilità di questi prodotti biostabilizzanti, destinati quindi alla sanificazione/igienizzazione delle superfici ed al controllo della carica microbica residente, ha suggerito la conduzione di una vasta ricerca sperimentale finalizzata alla verifica quali quantitativa, sia "*in vitro*" che "*su campo*", della loro efficacia rispetto all'impiego di trattamenti tradizionali a base di disinfettanti chimici.

	Degenza Medicina		Poliambulatorio	
	Sala T	Sala S	Cardiologia Oculistica	Ortopedia
1.a Fase 11.03.2011 14.04.11	PIP	Disinfettanti tradizionali	PIP	Disinfettanti tradizionali
2.a Fase 15.04.2011 16.05.2011	Disinfettanti tradizionali	PIP	Disinfettanti tradizionali	PIP
3.a Fase 16.07.2011 23.08.2011	PIP	PIP		

Tabella 1 – Riassunto sperimentazioni (“in campo”)

INQUADRAMENTO DELLE RICERCHE

Come si è anticipato, la ricerca si poneva l'obiettivo di verificare, sotto il profilo quali quantitativo, l'azione di tali prodotti sia “*in vitro*” che “*su campo*” rispetto all'impiego di trattamenti tradizionali a base di disinfettanti chimici. L'efficacia delle procedure utilizzate è stata valutata confrontando il valore della carica batterica potenzialmente patogena rilevata sulle superfici di ambienti nosocomiali trattate con prodotti PIP rispetto alla analoga carica ottenuta con prodotti tradizionali e calcolandone la differenza percentuale. I microrganismi oggetto di indagine sono stati quelli ritenuti più interessanti sotto il profilo delle infezioni ospedaliere: *Stafilococcus aureus*, *Pseudomonas species*, coliformi (compreso *Escherichia Coli*), *Candida albicans* e *Acinetobacter spp.*. Attualmente sono in corso ulteriori indagini sperimentali per ciò che attiene al *Clostridium spp.*.

Lo studio è stato condotto sia con prove *in vitro* che con prove *in situ* presso diverse strutture ospedaliere.

PROVE IN VITRO

Lo scopo delle prove “*in vitro*” (UNI ISO 13697:2001) consisteva nel verificare l'efficacia dell'azione com-

petitiva dei prodotti PIP rispetto ad altre specie batteriche in assenza di elementi esterni di disturbo (in laboratorio), ovvero di quei processi di ricontaminazione delle superfici trattate che avvengono naturalmente negli ambienti ad occupazione umana. Sono stati condotti esperimenti *in vitro* utilizzando campioni di materiali presenti in aree ospedaliere (cioè ceramica, PVC, gomma, vetro-china) con la soluzione a base di probiotico. Una soluzione contenente una concentrazione nota (30 x 10⁶ cellule/ml, 15 ml/m²) di *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e ceppi di *Staphylococcus aureus* è stata utilizzata per la contaminazione delle superfici di campionamento. La carica batterica è stata misurata mediante la determinazione del conteggio delle colonie su piastre RODAC (BD), contenente il mezzo TSA additivato con lecitina, istidina e Tween-20, al fine di neutralizzare l'azione dei disinfettanti. Il numero di colonie è stato determinato come carica microbica totale (TMC), o come specifico conteggio delle colonie sfruttando il metodo del ceppo specifico. Sono stati utilizzati piastre di controllo per la verifica della sterilità (1 piastra/lotto). A distanza di 1 ora dalla applicazione dei prodotti PIP sulle superfici campione, preventivamente inquinate con i vari ceppi microbici, la riduzione della concentrazione dei patogeni è risultata di 7 logaritmi (pari al 99,999%) rispetto alla conta iniziale.

PROVE IN SITU

Le prove su campo reale hanno interessato diverse strutture ospedaliere italiane (l'Arcispedale Sant'Anna di Ferrara e Cona, l'Ospedale S. Giorgio di Ferrara e l'Ospedale Del Delta di Lagosanto), oltre all'Ospedale di Lokeren (Belgio). Le prime sperimentazioni sono state condotte nel 2011 in alcune aree assistenziali dello stabilimento ospedaliero Arcispedale S. Anna. Le sperimentazioni “*su campo*” si prefiggevano invece l'obiettivo di verificare l'azione esercitata dai PIP in condizioni nosocomiali reali e quindi in presenza di continui fenomeni di ricontaminazione delle superfici trattate. Intenzionalmente si è scelto di condurre lo studio in ambienti ospedalieri di non recente costruzione e privi di impianto di filtrazione e ventilazione meccanica dell'aria, al fine di rendere maggiormente critici i processi di inquinamento. Sono state quindi individuate due diverse aree assistenziali dell'Ospedale S. Anna di Ferrara, delle quali la prima costituita da un'area di Degenza di Medicina Generale e la seconda da un'area Poliambulatoriale. Poiché entrambe risultano articolate in due reparti ciascuna (Sala S e Sala T nel primo caso e Oculistica/Cardiologia e Ortopedia nel secondo caso), è stato possibile condurre una sperimentazione parallela, applicando il protocollo che prevedeva l'impiego di probiotici in uno dei due reparti e il protocollo con prodotti tradizionali nel reparto rimanente della medesima area. I prodotti utilizzati nel protocollo tradizionale erano a base di cloro, mentre come prodotto probiotico è stato utilizzato il prodotto commercializzato dalla Crhysal (Lommel, Belgio). In questo modo si sono potuti confrontare i risultati dei diversi metodi di sanificazione in zone

Punto di campionamento	Agente patogeno	Degenza Medicina Fase 1 e 2	Poliambulatorio Fase 1 e 2	Valore Medio Finale Degenza 3a Fase (*)
Corridoio inizio e fine	Staphylococcus aureus	29,56%	36,64%	81,03%
	Coliformi spp.	72,38%	46,62%	79,72%
	Pseudomonas spp.	93,09%	64,49%	88,44%
	Candida spp.	68,88%	56,21%	68,47%
	Acinetobacter spp.		44,74%	
Pavimento servizio igienico	Staphylococcus aureus	58,75%	51,33%	85,88%
	Coliformi spp.	89,15%	78,13%	78,31%
	Pseudomonas spp.	55,28%	75,94%	78,57%
	Candida spp.	82,90%	67,80%	71,78%
	Acinetobacter spp.	74,25%		
Lavello servizio igienico	Staphylococcus aureus	55,74%	52,50%	95,59%
	Coliformi spp.	81,56%	75,83%	85,12%
	Pseudomonas spp.	67,53%	50,41%	95,16%
	Candida spp.	50,38%	27,93%	94,86%
	Acinetobacter spp.	16,39%	31,25%	75,99%

Tabella 2 – Riduzione percentuale dei potenziali patogeni ottenuta con il protocollo probiotico rispetto al protocollo con disinfettanti chimici

(della stessa area) con medesima destinazione d'uso, tipologia di utenza e caratteristiche di contaminazione.

A intervalli temporali prefissati sono stati rilevati i valori della carica batterica per patogeno di interesse, ottenibili mediante i due diversi sistemi di pulizia.

Per verificare la replicabilità dei risultati, si è poi pensato di invertire, dopo 1 mese, il tipo di procedura di pulizia tra i reparti di ciascuna area, come mostrato nella Tabella 1, continuando le sperimentazioni per un altro mese. Le campagne di monitoraggio sono state condotte ad intervalli di tempo regolari (circa ogni 2-3 giorni), sia alle ore 07:00, immediatamente dopo gli interventi di sanificazione, che alle ore 14:00. Ogni campionamento è stato effettuato in triplo, utilizzando piastre Rodac a contatto. I campionamenti sono stati condotti in diversi punti dei reparti interessati, così schematizzabili:

- inizio pavimento del corridoio di accesso al reparto;
- fine pavimento del corridoio;

- pavimento servizio igienico;
- lavello servizio igienico.

I primi due punti sono rimasti fissi durante l'intera sperimentazione, mentre quelli riguardanti il pavimento e il lavello del Servizio Igienico sono stati scelti in modo casuale (random) volta per volta, al fine di rappresentarne fedelmente lo stato medio di contaminazione sull'intero reparto. Preventivamente sono stati svolti prelievi microbiologici per la valutazione non solo della carica microbica totale iniziale esistente, ma anche della carica microbica dei potenziali patogeni. Questo momento è stato denominato come Tempo zero (T_0 ore 14,00).

La sperimentazione è poi proseguita con una terza Fase, iniziata in data 22.07.2011, e cioè a distanza di circa 1 mese dal termine della seconda Fase. In quest'ultimo periodo, protrattosi fino al 23.08.2011, si sono impiegati i prodotti probiotici PIP in entrambi i reparti della Degenza di Medicina, con lo scopo di verificare un eventuale ulteriore contenimento della carica pato-

gena dopo periodi prolungati di applicazione dei PIP. In totale, in questa prima ricerca, riguardante l'Ospedale S. Anna, sono stati effettuati complessivamente 12.528 prelievi. La procedura di campionamento delle superfici e le analisi microbiologiche sono stati eseguite in base alle "Linee Guida CONTARP-INAIL", 2005, alla "UNI EN ISO 19698:2004" e secondo le consuetudini codificate in letteratura [12]. L'impiego dei protocolli a base di probiotici, denominato PCHS, ha determinato una generalizzata compressione e stabilizzazione della carica patogena rispetto al caso delle procedure tradizionali.

Una volta ottenuti i valori di carica microbica per ogni campionamento e per ogni patogeno, è stato possibile calcolarne il valore medio per ciascuna fase e per ciascun protocollo di sanificazione e quindi la riduzione percentuale della carica medesima nel caso di impiego del protocollo con probiotici rispetto all'impiego di prodotti a base di cloro (Tabella 2). Sperimentalmente si è consta-

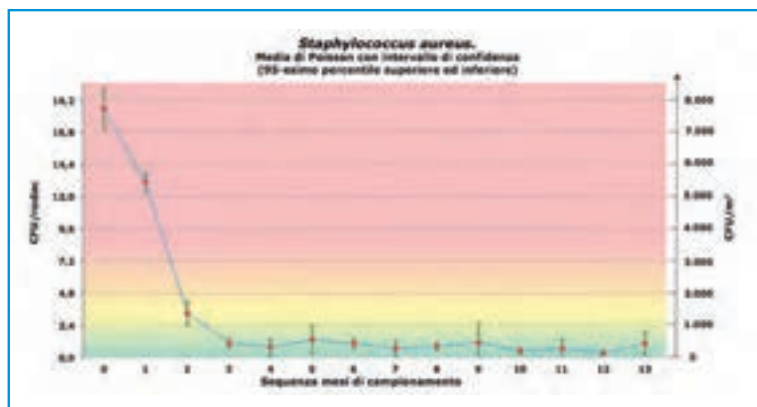


Figura 3 – Andamento della carica dello *Staphylococcus aureus*.

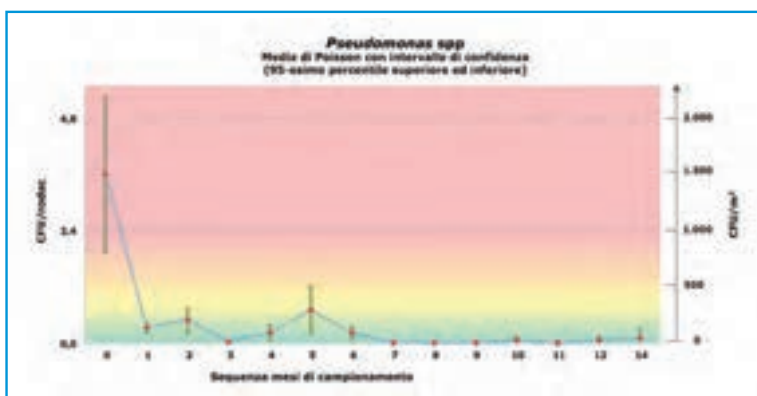


Figura 4 – Andamento della carica di *Pseudomonas spp.*

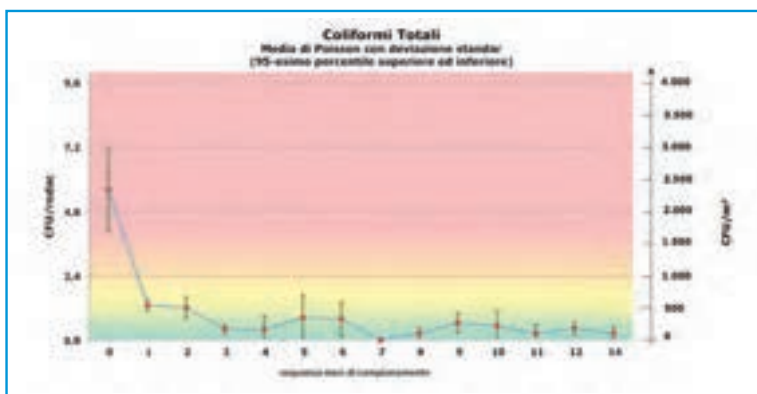


Figura 5 – Andamento della carica dei Coliformi totali

tato che un'azione prolungata dei protocolli probiotici (oltre 2 mesi) permette un sostanziale decremento/contenimento/stabilizzazione della carica microbica potenzialmente patogena rispetto al caso in cui gli ambienti siano trattati con prodotti tradizionali.

In numerosi casi i valori di abbattimento dei microrganismi di interesse sono prossimi al 90 %, come nel caso del lavello, che rappresenta una superficie critica per il paziente, per la possibilità di contatto con le mani e altre parti del corpo.

Ulteriori sviluppi delle attività di ricerca

A seguito dei positivi dati ottenuti nella prima fase della ricerca, si è voluto verificare l'ipotesi di una possibile relazione sussistente tra eventi infettivi (ICA) e caratteristiche microbiologiche ambientali. È stata quindi attivata una seconda ricerca sperimentale [3], basata su approccio integrato tra metodologia di sanificazione (sistema PCHS - Sistema Probiotico di Pulizia ed Igiene) e buone prassi igieniche (compliance delle mani), che ha permesso di constatare, in 14 mesi di campionamenti nell'Ospedale di San Giorgio di Ferrara una riduzione tendenziale di oltre il 60% degli eventi infettivi (ICA).

In questo passaggio, tuttavia, dovendosi logicamente attuare una politica a tutto campo di gestione del rischio infettivo, il protocollo di pulizia non si è limitato all'impiego di un particolare prodotto igienizzante (quello a base di probiotici), ma è stato integrato con un insieme di operazioni, tra loro coordinate, che prevedevano, tra l'altro, una adeguata formazione del personale, l'utilizzo di attrezzature, panni e materiali ad elevato contenuto tecnologico, nonché un programma di verifiche e controlli atti a garantire il raggiungimento di un idoneo livello di igiene degli ambienti.

L'analisi dei dati sopra esposti e la disponibilità delle risultanze di un elevato numero di campionamento (25.748) condotti complessivamente in diverse realtà ospedaliere permette un approccio più sistematico a consapevole delle procedure di sanificazione delle degenze.

I risultati ottenuti, hanno permesso di constatare che nel caso di impiego del sistema PCHS (con prodotti probiotici) si ottiene:

- una compressione della carica di microrganismi potenzialmente

patogeni di oltre l'80 % rispetto al caso di utilizzo di tecniche tradizionali a base di prodotti chimici;

■ la stabilizzazione della carica medesima sia nell'arco della giornata, con oscillazioni molto più contenute tra due successive sanificazioni, sia nei mesi successivi alla prima applicazione (in particolare a partire dal terzo mese). La lettura dei diagrammi riguardanti i diversi campionamenti effettuati fino ad oggi nelle varie strutture ospedaliere e per diverse superfici (Figure 3-7) è a supporto delle precedenti affermazioni. In questi grafici viene mostrato l'andamento della carica dei potenziali patogeni e della carica totale.

Gli andamenti sono stati ricavati applicando l'analisi di Poisson ed i relativi intervalli di confidenza. L'intervallo di confidenza superiore rappresenta il 95-esimo percentile superiore (il 95 % dei dati raccolti ha un valore che sta al di sotto di tale limite), mentre l'intervallo di confidenza inferiore rappresenta il 95-esimo percentile inferiore (il 5 % dei dati ha un valore inferiore a quello indicato). Si può notare che al mese 0, corrispondente all'inizio della prima applicazione del sistema PCHS, e quindi al valore della contaminazione ottenibile mediante i prodotti chimici tradizionali, la carica dei microrganismi è significativamente più elevata che nel restante periodo, con una progressiva diminuzione che diventa del tutto stabile a partire dal terzo mese, in corrispondenza del quale, evidentemente, la colonizzazione da parte dei *Bacillus spp.* diventa predominante.

La valutazione della contaminazione microbiologica

La contaminazione microbica viene comunemente valutata utiliz-

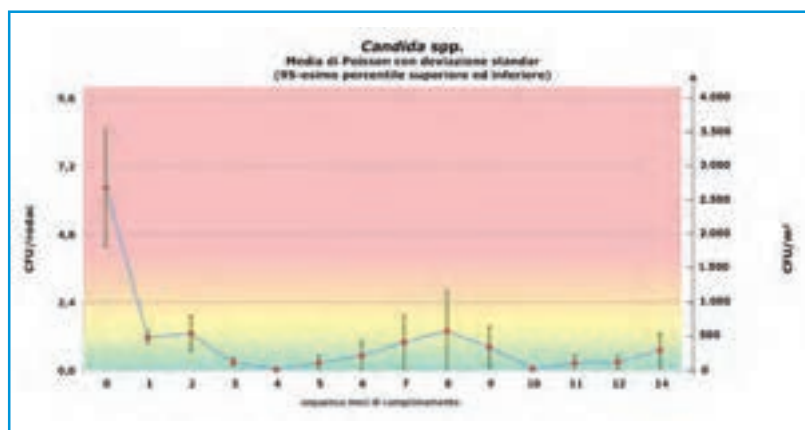


Figura 6 – Andamento della carica di *Candida spp.*

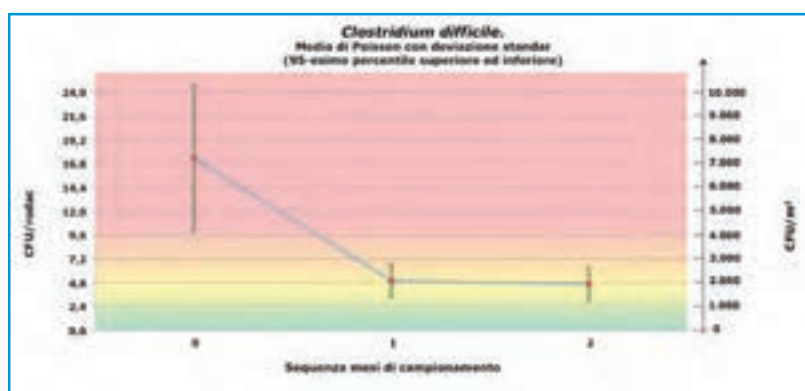


Figura 7 – Andamento della carica di *Clostridium difficile*

zando metodi basati sull'analisi di piastre Rodac o Petri (mediante conteggio delle UFC per unità di superficie) contenenti terreno solido selettivo o per crescita non specifica.

In letteratura è consolidato l'utilizzo dell'indice I.M.S. di Pitzurra (indice microbico di superficie), che rappresenta il valore della contaminazione totale (UFC/cm²) per le sale operatorie [12].

Tale indice è rappresentativo tuttavia dello stato di contaminazione di una superficie negli istanti immediatamente successivi ad un trattamento di sanificazione (30 minuti dopo), inteso questo come disinfezione (chimica) delle superfici di interesse, ovvero come abbattimento della carica microbiologica indistinta, riferita a tutti i microrganismi, e non solo a quelli potenzialmente patogeni.

Questo parametro, tuttavia, mal si presta alla valutazione dei risultati prima esposti.

In primo luogo, mentre le sale operatorie sono da considerarsi ambienti ad elevato rischio infettivo, in cui è prevista l'assenza pressoché totale di carica batterica, non altrettanto si può dire per un reparto di degenza o per un Poliambulatorio. In secondo luogo, una volta sanificate le superfici di una sala operatoria, l'ambiente viene compartimentato e climatizzato con filtrazione assoluta. I processi di ricontaminazione che avvengono sono unicamente imputabili alla crescita naturale dei microrganismi eventualmente sopravvissuti alla disinfezione. Al contrario, nelle degenze l'aumento della carica microbica, è riconducibile soprattutto ai fenomeni di ricontaminazione per il

UFC/m ²	Prot.tradiz. (*) 30 min dopo sanif.	Prot.tradiz. (*) 7 ore dopo sanif.	Prot. Probio. (**) 7 ore dopo sanif.	Prot.probio. (**) 24 ore dopo sanif.
St. aureus	5.460	9.750	1.470	3.050
E.coli	941	2.301	460	1.160
Pseudomonas spp.	439	929	121	482
C.albicans	431	1.513	378	627

Tabella 3 – Andamento della carica microbica nel tempo

(*) a base di prodotti chimici – (**) a base di probiotici

passaggio di persone e materiali ed ai fenomeni di sedimentazione gravitazionale del pulviscolo atmosferico. In terzo luogo, sempre per le degenze ospedaliere, non è utile stabilire un valore di soglia massima di contaminazione negli intervalli temporali immediatamente successivi all'atto della pulizia, poiché i processi di crescita dei microrganismi hanno natura dinamica e comportano un aumento esponenziale della conta batterica anche nell'arco di alcune ore.

La valutazione della contaminazione superficiale mediante l'impiego del metodo della conta totale dei microrganismi (UFC) non è quindi per nulla descrittiva dell'effettivo rischio di contrarre infezioni da parte del paziente. Nel caso dell'impiego dei probiotici, la popolazione microbica che si consolida sulle superfici sanificate con prodotti probiotici è in massima parte costituita da *Bacillus spp.*, considerati sicuri per la salute umana, e solo in minima percentuale è costituita da altre specie batteriche.

Pertanto è conveniente utilizzare sempre il metodo del conteggio delle UFC/m², per unità di superficie (UFC/m²), ma ricavandola per singolo microrganismo potenzialmente patogeno. Poiché la carica batterica varia al passare del tempo, è conveniente inoltre che i campionamenti microbiologici siano effettuati alle ore 14:00, cioè a circa 7 ore di distanza dalla sanificazione del mattino, e prima

del ripasso quotidiano. +Infatti, dalle indagini effettuate confrontando i diversi risultati per momenti diversi della giornata, si sono ottenuti i risultati esposti in Tabella 3.

Si osserva a questo proposito che per il protocollo chimico le UFC/m² grossomodo raddoppiano dai primi istanti successivi alla disinfezione a circa 7 ore dopo; per quanto riguarda il trattamento con probiotici le UFC/m² raddoppiano o triplicano (per effetto dei fenomeni di ricontaminazione) passando da 7 ore successive al trattamento a 24 ore dopo il medesimo, quindi con una cinetica decisamente inferiore rispetto al caso precedente.

Allo stato attuale il dato di maggiore interesse risiede comunque nel fatto che a distanza di 24 ore dall'intervento di pulizia la contaminazione con protocollo probiotico risulta addirittura la metà o un terzo di quella che si ottiene con la disinfezione chimica negli istanti successivi alla disinfezione.

Inoltre l'ampiezza di oscillazione dei valori nel caso dei probiotici è molto più ridotta rispetto al protocollo alternativo e quindi si produce sul campo un effetto di *bio-stabilizzazione* dei potenziali patogeni.

Proposta di nuovi indicatori dell'igiene ambientale

E' evidente che, indipendentemente dalle modalità con cui viene espletata, la sanificazione

ospedaliera è un processo di tipo industriale, e quindi deve essere associata ad una metodologia di verifica su campo dei risultati ottenuti, con la conseguente individuazione di una scala di valori e di criteri di accettabilità degli *outcomes* finali. Si ritiene pertanto metodologicamente corretto proporre in questa sede l'introduzione di un Indice di Qualità Microbiologica (IQM) per la misura del livello di igiene dei reparti ospedalieri, con la esclusione delle aree classificate ad alto rischio e delle sale operatorie. Le caratteristiche della scala di misura sono le seguenti:

- le UFC/m² rappresentano l'unità di misura assunta a campione;
- il rilevamento della contaminazione superficiale viene effettuato mediante piastre Rodac addizionate ai seguenti terreni selettivi e differenziativi: Baird Parker Agar (BD); Cetrimide Agar; Sabouraud Dextrose Agar+CFL (SDA) e Mac-Conkey Agar;
- le piastre devono essere appoggiate sulla superficie da campionare; deve essere effettuata una leggera pressione per 30 sec;
- i campionamenti devono essere effettuati almeno in doppio (possibilmente in triplo) e le piastre, una volta incubate e lette, devono essere fotografate ed archiviate prima del loro smaltimento;
- le superfici oggetto di campionamento sono in particolare quelle con cui viene a contatto

il paziente (comodino, testata del letto etc..) e quelle delle superfici oggetto di trattamento (pavimento degenza, pavimento corridoio reparto nelle zone di massimo passaggio, pavimento bagno e apparecchi sanitari);

■ devono essere monitorate le UFC/m² dei singoli patogeni *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas species*, coliformi (compreso *Escherichia coli*), *Candida albicans*, *Acinetobacter spp.*, *Clostridium spp.*

■ devono essere monitorate anche le UFC/m² della carica totale (ciò al fine di poter identificare, nel caso di impiego del protocollo con probiotici, la presenza dei *Bacillus spp.* a scopo di controllo della corretta applicazione del prodotto);

■ i campionamenti devono essere effettuati a 7 ore circa dopo la sanificazione (ore 14:00), prima del ripasso quotidiano;

■ il numero di campionamenti deve poter permettere il raggiungimento di un risultato statisticamente significativo.

In base ai risultati esposti nelle precedenti Figure, è stato possibile individuare una scala di valori di accettabilità delle procedure di sanificazione, riportato in Tabella 4 nel caso di impiego dei probiotici.

Nulla vieta ovviamente di utilizzare un qualunque prodotto alternativo a quello a base di probiotici purchè si rispettino i valori di soglia, al di sopra dei quali il risultato del trattamento di sanificazione viene giudicato negativo.

Il principio cardine che si propone in questa sede consiste nel fatto che, indipendentemente dal tipo di protocollo scelto, si utilizzi un metodo unico, condiviso e oggettivo di valutazione della efficacia del trattamento, al fine di introdurre un metodo di misura dei risultati ottenuti.

Ore 14:00	I.Q.M. indice di qualità microbiologica
S.aureus	< 1.000 UFC/m ²
Pseudomonas spp.	< 500 UFC/m ²
Coliformi totali	< 500 UFC/m ²
Candida spp.	< 1.000 UFC/m ²
Clostridium difficile	< 2.000 UFC/m ²

Tabella 4 – Scala di accettabilità dell'Indice di Qualità Microbiologica IQM

LA SICUREZZA DEI PRODOTTI PROBIOTICI

Il genere *Bacillus* comprende batteri gram-positivi, che si presentano in natura sotto la forma vegetativa e di spora (per questo motivo vengono definiti bacilli sporigeni); sono saprofiti, ampiamente diffusi in natura (ubiquitari) e sono comunemente isolati da ambienti, quali acqua, suolo [4], aria, e residui vegetali in decomposizione. Tra i batteri probiotici del genere *Bacillus*, la specie più studiata, che si può anche trovare in alcuni integratori probiotici, è quella del *Bacillus subtilis* [8].

Già una decina di anni fa il suo genoma è stato completamente sequenziato e sono stati pubblicati tre studi di ricerca a favore della sua sicurezza come probiotico [9-12].

La forma vegetativa, con metabolismo aerobio e anaerobio facoltativo e con poche esigenze nutrizionali, è in grado di moltiplicarsi e di colonizzare l'ambiente competendo con altri batteri potenzialmente patogeni. La spora permette invece la permanenza del microorganismo nell'ambiente in condizioni avverse, mantenendo la capacità di germinare non appena si rinnovano condizioni favorevoli per la forma vegetativa. Gli effetti benefici di spore di *B. subtilis*, come preparazione probiotica, sono relativi all'equilibrio della microflora intestinale per il trattamento o per la prevenzione di disturbi intestinali [10].

I dati su infezioni sostenute da *B.*

subtilis sono scarsi, e nella statistica dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, riguardante le cause di morte, non ne esistono affatto. Il potenziale patogeno *B. subtilis* è generalmente descritto come basso o assente [9,10]. Inoltre nel genoma del *Bacillus subtilis* non sono stati riscontrati geni responsabili di produzione di tossine o altre sostanze nocive, quali emolisina e lecitinasi. In un esperimento (6) queste sono state somministrate a lungo a cavie di laboratorio senza effetti collaterali. Tutti i ceppi di *Bacillus spp.* testati sono sensibili agli antibiotici [13]. Il fenomeno delle resistenze microbiche agli antibiotici deriva soprattutto dal potenziale trasferimento genico da alcuni batteri, che possiedono questi geni di resistenza, ai batteri patogeni, che a loro volta sono in grado di acquisire resistenza o di sviluppare delle multiple antibiotico-resistenze.

Nel 2008 è stato condotto uno studio sulla resistenza agli antibiotici del genere *Bacillus*; tutti i ceppi si sono rilevati sensibili a tutti gli antibiotici usati frequentemente nel campo medico, come riportato dal report dell'European Food Safety Authority (EFSA) [14].

Sono stati effettuati numerosi test di tossicità acuta e subcronica sugli animali; studi "in vitro" sono stati eseguiti su un certo numero di specie, tra cui *B. subtilis* var. natto (5), *B. indicus* [9], *B. coagulans* [19] e *B. subtilis* 2335 [10], senza rilevare nessun effetto indesiderato.

Il *Bacillus subtilis* è utilizzato con sicurezza nella produzione di enzimi di tipo alimentare e, negli ultimi dieci anni, ceppi ricombinanti di *Bacillus subtilis* sono stati utilizzati con sicurezza nella fabbricazione di una varietà di prodotti edibili bio-industriali, quali enzimi, vitamine, antibiotici, biopolimeri, additivi e per la produzione di determinati alimenti, come miso in Giappone (da *B. subtilis* var. *natto*).

Gli enzimi derivati da *B. subtilis* sono alfa-acetolattato decarbossilasi, alfa-amilasi, betaglucanasi, glutaminasi, maltogenici amilasi, pullulanasi, proteasi e xilanasi. Il *B. subtilis* è classificato come Classe 1 (rischio nessuno) dal National Institute of Health (NIH - US) [15]; non è tossigeno in base ai criteri della US Environmental Protection Agency (EPA) ed è uno dei 10 organismi ospiti a beneficiare di un'esenzione Tier I nell'ambito della normativa EPA, riguardante la classificazione del rischio.

Inoltre il *B. subtilis* è utilizzato come inoculante nel suolo in orticoltura e agricoltura. Enzimi prodotti da *B. subtilis* sono ampiamente utilizzati come additivi ad attività biologica pulente in ammollo nei detersivi per bucato.

Una notevole gamma di cibi fermentati si ritengono ottenuti anche per l'attività proteolitica ed enzimatica del *Bacillus subtilis*.

Il *B. subtilis* ceppo QST 713 (commercializzato come QST 713 o *Serenade*) ha un'attività fungicida naturale, ed è impiegato come agente di controllo biologico [19]. I prodotti a base di *Bacillus* spp. sono popolari in tutto il mondo prima dell'introduzione degli antibiotici come vaccini subtilici, ovvero come agenti immunostimolanti per aiutare il trattamento delle malattie del tratto gastrointestinale e urinario. In conclusione è possibile affermare che i bat-

teri del genere *Bacillus*, in quanto considerati sicuri, sono utilizzati in agricoltura [19, 20], orticoltura, nella alimentazione umana [21] e in veterinaria [22, 24].

Diverse specie di *Bacillus* sono state classificate GRAS (Generally Regarded As Safe), poiché usate in processi alimentari o in preparazioni farmaceutiche, e quindi riconosciute dalla FDA (Food and Drug Administration) come trattamenti per scopi umani senza effetti collaterali [16, 25, 27].

Non inducono la formazione di batteri patogeni, sono biodegradabili e sicuri per l'ambiente.

Nonostante i dati disponibili ad oggi in letteratura siano del tutto rassicuranti a questo proposito, sono state ugualmente adottate procedure di verifica della sensibilità all'azione dei comuni antibiotici dei microorganismi *Bacillus* spp. presenti sulle superfici sanificate. Tutti gli antibiogrammi effettuati in campo hanno confermato l'assenza di alcun genere di resistenza. Tale procedura verrà integrata prossimamente con test di tipo molecolare (*plasmid curing*) mediante analisi PCR, per accertare eventuali acquisizioni di caratteri di virulenza e/o resistenza non compresi negli antibiogrammi di routine.

CONCLUSIONE

L'utilizzo del Sistema PCHS, basato sull'impiego dei probiotici nelle procedure di sanificazione di degenze ospedaliere si è rilevato essere una tecnica di sicuro interesse, essendo in grado di ridurre dell'80 % circa ed oltre i livelli di carica batterica potenzialmente patogena, di fatto indipendentemente dalle superfici sanificate. Tuttavia un corretto sistema di pulizia delle degenze ospedaliere non è centrato solo sullo specifico agente o prodotto impiegato, ma su di un insieme integrato di

operazioni e controlli incrociati in grado di garantire le Direzioni Sanitarie in termini di efficacia del risultato complessivo e di valorizzazione e quantificazione del risultato medesimo.

Quanto affermato determina comunque la necessità di un salto culturale da parte degli operatori privati e pubblici del settore, determinato dalla esigenza di approfondire sotto il profilo scientifico le consuetudini in uso, allo stato dei fatti poco o per nulla basate su idonee sperimentazioni di campo, e le corrette modalità di interpretazione e valutazione dei campionamenti microbiologici comunque condotti.

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M and Chiarello L. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control* 2007;35:S65-164
2. Lanini S, Jarvis WR, Nicastrì E, et al. Healthcare-associated infection in Italy: annual point-prevalence surveys, 2002-2004. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:659-65
3. Nicastrì E, Petrosillo N, Martini L, Larosa M, Gesu GP and Ippolito G. Prevalence of nosocomial infections in 15 Italian hospitals: first point prevalence study for the INF-NOS project. *Infection* 2003;31 Suppl 2:10-5
4. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis* 2004;39:1182-9
5. Frabetti A, Vandini A, Balboni P, Triolo F and Mazzacane S. Experimental evaluation of the efficacy of sanitation procedures in operating rooms. *Am J Infect Control* 2009;37:658-64
6. S. Mazzacane, P.G. Balboni, A. Vandini, A. Frabetti, P. Antonioli, M. C. Manzalini, M. Rovigatti - Sperimentazioni di tecniche di biostabilizzazione nelle procedure di sanificazione delle

degenze ospedaliere - 2011, L'Ospedale, n. 4/11 pagg 52-58

7. S. Mazzacane, P. G. Balboni, A. Vandini, A. Frabetti, P. Antonioli – L'evoluzione delle procedure di sanificazione negli ospedali: prospettive di riduzione e controllo della carica batterica potenzialmente patogena mediante tecniche di stabilizzazione - 2012, L'Ospedale, n. 2/12 pagg 78-83
8. Logan, N.A. (2004) Safety of Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In *Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Applications* (Ricca E. et al., eds.). Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, UK.: 93-105
9. Hong, H.A., Huang, J.-M., Khaneja, R., Hiep, L.V., Urdaci, M.C. & Cutting, S.M. (2008) The Safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 105: 510-520.
10. Sorokulova, I.B., Pinchuk, I.V., Denayrolles, M., Osipova, I.G., Huang, J.M., Cutting, S.M. & Urdaci, M.C. (2008) The Safety of Two *Bacillus* Probiotic Strains for Human Use. *Digestive Diseases and Sciences* 53: 954-963.
11. Tompkins, T.A., Hagen, K.E., Wallace, T.D. & Fillion-Forte, V. (2008) Safety evaluation of two bacterial strains used in asian probiotic products. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 391-400.
12. Issue 2 March 2009 *Bacillus subtilis* – Identification & Safety Peter Cartwright BA (Hons) MA MSc - Human Microbiota Specialist Probiotics International Ltd. Somerset, U.K.
13. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)3,4 European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy.
14. EFSA (2005) 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. *EFSA Journal* 226: 1-12.
15. Food and Drug Administration.

Statement of Policy for Regulating Biotechnology Products. *Federal Register*, 51: 23301-23350, June 26, 1986.

16. Environmental Protection Agency. Microbial products of biotechnology: final regulation under the Toxic Substances Control Act; final decision document. *Federal Register* 62: 179 10- 1795 8, 1997.
17. *Journal of animal and Veterinary Advances* 11 (14): 2392-2397, 2012 ISSN:1680-5593 Several Indicators of Immunity and Antioxidant Activities Improved in Grass Carp Given a Diet Containing *Bacillus* Additive- W.F.Li, B. Deng, Z.W.Cui, L.Q.Fu, N.N. Chen, X.X.Zhou, W.Y. Shen and D.Y.Yu.
18. Murillo I, Villamil L (2011) *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *J Aquac Res Development* S1:007. doi:10.4172/2155-9546.S1-007
19. *Int J Agric & Biol Eng* (December, 2009) Open Access Vol. 2 No.4 55 Effect of *Bacillus Subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth. Yang Zongzheng, Liu Xin, Liu Zhong, Pang Jinzhao, Qiu Jin, Yang Wenyan)
20. *Informatore Fitopatologico* (Jul-Aug 1999) Biological control of plant pathogens by *Bacillus subtilis* Roberti, R.; Selmi, C. Bologna Univ. (Italy).
21. Endres JR, Clewell A, Jade KA, Farber T et al (2009) Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food Chem Toxicol*.
22. *EFSA Journal* 2009; 7(9):1314 Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Bacillus subtilis* PB6 (*Bacillus subtilis*) as a feed additive for chickens for fattening- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).
23. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2597. <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/2597.htm>

24. *EFSA Journal* 2011;9(11):2445 Suggested citation: EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) - Panel Members Guidance of the Scientific Committee/Scientific Panel On request from: EFSA Question number: EFSA-Q-2009-00973 Adopted: 15 November 2011 Published: 25 November 2011 Affiliation: European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy.
25. Food and Drug Administration. Statement of Policy for Regulating Biotechnology Products. *Federal Register*, 51: 23301-23350, June 26, 1986.
26. FAO/WHO. (2001) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report
27. FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.