

Copma ha sviluppato il Sistema PCHS in collaborazione con l'Università degli Studi di Ferrara e l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara. I risultati delle ricerche sono stati oggetto di pubblicazioni scientifiche internazionali.

Di seguito viene riportato un nuovo articolo scientifico realizzato a cura dell'Università degli Studi di Ferrara (CIAS - Dipartimento di Scienze Mediche - Dipartimento di Architettura) - Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara (Dipartimento di Controllo e Prevenzione Infezioni e Gestione del Rischio).

LA SANIFICAZIONE DELLE SUPERFICI OSPEDALIERE MEDIANTE IL SISTEMA PCHS A BASE DI PROBIOTICI E LE RICADUTE SUI FENOMENI DI ANTIBIOTICO RESISTENZA.

Elisabetta Caselli*^{1,2}, Maddalena Coccagna², Paola Antonoli³, Maria D'Accolti^{1,2}, Luca Lanzoni², Maria Teresa Camerada^{2,4}, Matteo Bisi², Antonella Volta², Micol Piffanelli², Pier Giorgio Balboni², Dario Di Luca^{1,2}, Sante Mazzacane²

¹ Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara, Ferrara, Italia; ² CIAS Centro ricerche interdipartimentale per il controllo dell'inquinamento in ambienti ad elevate sterilità, Università di Ferrara, Ferrara, Italia; ³ Dipartimento di Controllo e Prevenzione Infezioni e Gestione del Rischio, Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Anna, Ferrara; ⁴ Dottorato di Ricerca in Architettura e Pianificazione Urbanistica, Dipartimento di Architettura, Università di Ferrara, Ferrara, Italia.

Negli ultimi anni l'assistenza sanitaria ha subito profondi cambiamenti. A partire dagli anni '90 sono progressivamente aumentate l'età media dei pazienti ricoverati, la frequenza dei degenti con pluripatologie e la complessità di operazioni mediche a volte molto invasive. Questi fattori contribuiscono fortemente ad aumentare il rischio clinico per i pazienti di contrarre infezioni durante la permanenza in strutture sanitarie e rendono le Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA) tra le complicanze più frequenti che si possono verificare a seguito del percorso assistenziale. Il frequente uso indiscriminato di antibiotici, che promuove la proliferazione di microrganismi antibiotico-resistenti, aggrava ulteriormente il quadro clinico del paziente già compromesso, che sarà di conseguenza curato con maggiore difficoltà, e inevitabilmente in tempi più prolungati.

Il trend di questi fenomeni è in aumento, come dimostrato da uno studio di prevalenza eseguito dall'ECDC (*European Center for Disease Control*), in cui si conferma che le infezioni associate alle cure sanitarie rappresentano un grave problema di salute pubblica in Europa, con valori attesi del 5,7% (4,5-7,4%); ciò implica che, negli ospedali europei, sono presenti giornalmente una media di 81.089 pazienti (da 64.624 a 105.895) con una ICA [1]. Il rapporto del WHO (*World Health Organization*) pubblicato nel 2011, calcola che in media il 7% dei pazienti, nei Paesi sviluppati, ed il 10% in quelli in via di sviluppo, possono acquisire un'infezione correlata all'assistenza, con un tasso di mortalità del 10%, con una prevalenza compresa tra 5,7% e 19,1%. In Europa, è stato stimato che, circa 4 milioni di pazienti ogni anno contraggono un'infezione correlata all'assistenza sanitaria, con circa 37.000 decessi direttamente ascrivibili alle ICA, e 110.000 decessi infausti in cui le ICA rappresentano una concausa [1,2,11]. In Italia si contano annualmente da 450.000 a 700.000 casi di ICA (incidenza del 5-8%), direttamente responsabili di circa 5.000 decessi. Ipotizzando la possibilità di prevenzione con corrette misure di controllo, si stima che una quota annuale pari a circa il 20-30% di tali infezioni sarebbero potenzialmente prevenibili, ciò si tradurrebbe in 135.000-210.000 infezioni e 1.000-2.000 decessi in meno, ogni anno [1].

Le ICA determinano un aggravio in termini di prognosi del paziente, con incremento della mortalità, determinando sia un impatto negativo a livello clinico sia una diretta incidenza sull'aspetto economico. Un'infezione contratta durante la permanenza in ospedale porta infatti ad un incremento notevole dei costi, a causa del prolungamento del ricovero e della terapia antibiotica, del maggior ricorso ad esami di laboratorio e dell'aumento del carico di lavoro del personale sanitario. Un solo caso di sepsi ospedaliera, ad esempio, porta ad un prolungamento medio della degenza di 15 giorni, con aumento della spesa correlata stimato tra 5.000 e 50.000 euro [3].

Nell'intento generale di ridurre il più possibile il rischio infettivo in ambiente ospedaliero, uno dei fattori di maggiore impatto riguarda la correlazione tra l'insorgenza di ICA causate dalla presenza di microrganismi esogeni, ovvero trasmessi dall'ambiente al paziente, e l'efficacia delle procedure di pulizia nel ridurre la presenza di microrganismi patogeni sulle superfici. Studi recenti hanno dimostrato che le superfici costituiscono un serbatoio per la diffusione dei microrganismi. Di conseguenza, l'ambiente incide visibilmente nel processo di contaminazione del paziente, contribuendo alla trasmissione dei patogeni nosocomiali ed aumentando il rischio di contaminazione crociata fra degenti [4].

L'applicazione di un efficace sistema di pulizia dell'ambiente ospedaliero potrebbe dunque ridurre l'insorgenza delle infezioni nosocomiali [1].

Molteplici studi hanno dimostrato che più del 50% delle superfici nelle stanze di degenza, se non igienizzate in modo adeguato, possono presentare un alto livello di contaminazione da parte di microrganismi patogeni ospedalieri come lo *Staphylococcus aureus* Meticillino-Resistente (MRSA), la cui presenza è stata rilevata su 1-27% delle superfici, con un picco del 64% in reparti per il trattamento di gravi ustionati. Altri microrganismi quali *Enterococchi* Vancomicina-Resistenti (VRE), *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Clostridium difficile* e virus (Es. *Norovirus*), mantengono capacità infettiva per settimane. Inoltre, batteri sporigeni come *Clostridium difficile* possono sopravvivere in forma di spora per mesi sulle superfici inanimate e asciutte [5].

Le linee guida internazionali raccomandano di adottare specifiche procedure di disinfezione, che prevedono una corretta e minuziosa sanificazione delle superfici, finalizzate a ridurre il livello di contaminazione patogena nosocomiale e di conseguenza a promuovere la diminuzione delle ICA [4].

Le ICA che si manifestano più frequentemente tra i pazienti ricoverati riguardano in particolare infezioni del tratto urinario, polmonare, gastrointestinale, del sito chirurgico e del circolo sanguigno; pertanto, durante le analisi della contaminazione ambientale, sono stati posti in evidenza soprattutto i microrganismi patogeni frequentemente isolati da questo tipo di infezioni, inclusi: *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Candida spp.*, *Clostridium difficile* ed *Acinetobacter spp.* [1-4].

La maggior parte delle procedure di sanificazione superficiale proposte si basa sull'impiego di prodotti chimici convenzionali, sicuramente efficaci nel determinare l'abbattimento immediato della maggior parte dei patogeni, ma con un effetto che non perdura nel tempo. L'incapacità di prevenire il ripristino della contaminazione batterica, ossia la ricontaminazione superficiale, determina la necessità di utilizzare costantemente i detergenti e disinfettanti chimici che, nel tempo, provocano un impatto ambientale non trascurabile, aumentano il rischio per la sicurezza del personale e facilitano lo sviluppo di fenomeni di multi-resistenza da parte dei microrganismi nosocomiali, una componente aggravante per la gestione delle ICA [5].

In sintesi, l'utilizzo di prodotti chimici per la sanificazione di superfici nosocomiali presenta i seguenti limiti:

- ✓ Scarsa efficacia nel tempo (normalmente 20-30 minuti dopo l'applicazione, i microrganismi ricominciano a moltiplicarsi esponenzialmente);
- ✓ Promozione della capacità dei microrganismi di mutare e sviluppare multi-resistenze;
- ✓ Aumento dell'inquinamento ambientale derivato dal massiccio impiego di composti chimici che si accumulano e persistono nel tempo [8].

Per tali motivi è necessario sviluppare nuovi metodi di pulizia dell'ambiente nosocomiale, più efficaci, sostenibili e capaci di attenuare i fattori di adattamento da parte di agenti patogeni come miceti e batteri.

L'idea di utilizzare sanificanti a base di probiotici nasce dall'ipotesi di ripristinare sulle superfici trattate una microflora batterica benefica per il paziente, in grado di competere con gli agenti patogeni eventualmente presenti.

In letteratura è stato proposto il termine di "igiene bidirezionale" ossia un equilibrio ottimale nella vigilanza, integrando la lotta con il ripristino [10]. Questo concetto prende spunto dall'evoluzione della virulenza, i patogeni cercheranno di massimizzare la loro possibilità di sopravvivenza nel tempo riducendo al minimo il danno per l'ospite, evolvendo in una coesistenza benigna. Un sito privo della maggior parte dei potenziali concorrenti consente una riproduzione senza moderazione, con il proliferare di uno o più ceppi patogeni liberi di competere nello stesso ospite con sviluppo di resistenze. Quindi, nello stesso modo è preferibile un equilibrio fra le buone pratiche igieniche e il ripristino del normale comunità microbiche. Per impedire lo sviluppo di resistenze [10].

Va posto in evidenza il fatto che i disinfettanti tradizionali non sono in grado di eliminare tutti i microrganismi presenti in un ambiente, con l'aggravante che specie patogene possono sopravvivere e trasmettere le loro resistenze costitutive o acquisirne di nuove. Secondo una lista pubblicata dall'OMS nel 2017, il numero di resistenze agli antibiotici è in crescita, con priorità legate ad alcuni specifici patogeni: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e le Enterobacteriaceae, tutti capaci di determinare gravi infezioni, quali polmoniti e setticemie, nei pazienti con il sistema immunitario compromesso come i trapiantati ed anziani [12]. I ceppi più pericolosi sono diventati resistenti anche ai carbapenemi, l'unica classe di antibiotici che ancora li eliminava in modo efficace. Nella classifica dell'OMS, a seguire, sono menzionati *Enterococcus faecium*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, responsabile di polmoniti e meningiti,

Haemophilus influenzae, che causa otiti, e *Shigella spp.*, responsabile di infezioni intestinali come la dissenteria. Secondo l'allarmistico rapporto "Review on Antimicrobial Resistance", voluto dal premier britannico David Cameron a metà del 2014, si prevede che nel 2050 le infezioni per cui non esisteranno farmaci adatti potrebbero causare un decesso ogni 3 secondi, fino ad arrivare ad uccidere 10 milioni di persone [12].

Recentemente, è stato proposto un nuovo sistema di pulizia, denominato *Probiotic Cleaning Hygiene System* (PCHS), che prevede l'utilizzo di detergenti ecologici addizionati a spore di probiotici appartenenti al genere *Bacillus* (specie *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*), e che si è dimostrato in grado di ridurre dell'80-90% la contaminazione delle superfici ospedaliere [6-7]. Si è infatti osservato che le spore di *Bacillus*, una volta applicate alle superfici, hanno la capacità di germinare, contrastando la crescita e la sopravvivenza di specie microbiche potenzialmente patogene, grazie ad un'azione di esclusione competitiva, in accordo con il principio di Gause [3-5]. Secondo tale principio, specie microbiche diverse, presenti nello stesso microcosmo ecologico, non possono coesistere in equilibrio se fanno riferimento agli stessi substrati nutritivi; tra di esse solo una specie, normalmente la meno esigente per fattori nutrizionali e che meglio si adatta all'ambiente, predomina sulle altre, causandone talvolta l'estinzione. I microrganismi probiotici introdotti artificialmente nell'ambiente, creano un nuovo biofilm che destabilizza la popolazione microbiologica e/o sostituisce quello preesistente derivante da altri microrganismi. Grazie al protocollo di pulizia denominato PCHS, è dunque possibile introdurre il concetto di *biostabilizzazione* di specie apatogene rispetto ad altre, inteso più in generale come il raggiungimento di un livello di igiene stabile e duraturo [7].

Il genere *Bacillus* comprende specie Gram-positive, saprofiti ed ubiquitarie, comunemente isolate da ambienti quali acqua, suolo, aria e residui vegetali in decomposizione. Tra i batteri probiotici del genere *Bacillus*, la specie più studiata è il *Bacillus subtilis*, il cui genoma è stato completamente sequenziato. Tutte le specie di *Bacillus* sono considerate apatogene (classe di rischio 1, secondo la classificazione WHO ed EFSA), e a tutt'oggi non sono riportati casi di morte dovuti ad infezione da *B. subtilis* [7].

Questo lavoro propone la revisione critica della strategia di sanificazione denominata "sistema PCHS", prefiggendosi l'obiettivo di ridefinire il concetto di igiene ospedaliera, non più centrato solamente sul tipo di prodotto utilizzato e sul protocollo sanificante adottato, ma anche sull'insieme di tecniche e metodiche comportamentali, sulla formazione ed educazio-

ne del personale e sulla possibilità di verificare in maniera sistematica i risultati ottenuti, così da costruire un sistema integrato di interventi [7].

Sintesi delle ricerche

Ad oggi sono state condotte diverse ricerche in questo campo di indagine da parte del laboratorio CIAS dell'Università di Ferrara. Queste sono state sviluppate secondo il seguente schema:

1. test “*in Vitro*” ed “*in Campo*” dell'azione competitiva dei *Bacillus* nel contrastare la proliferazione di alcune tra le principali specie patogene batteriche e fungine;
2. test “*in Campo*” per valutare l'impatto del sistema PCHS sulle caratteristiche di farmaco-resistenza della popolazione patogena residente su superfici nosocomiali;
3. analisi della sicurezza biologica relativa all'impiego del sistema PCHS su una significativa popolazione di pazienti.

Test di efficacia “*in vitro*” ed “*in campo*”

Gli ambienti ad occupazione umana, a seguito di sanificazione, vengono naturalmente ripopolati da diverse specie di microrganismi fra cui quelle patogene.

Per valutare la capacità dei *Bacillus* del PCHS di limitare la crescita dei microrganismi che sono correlati a tali fenomeni di ricontaminazione, sono stati effettuati studi *in vitro* (secondo normativa UNI EN 13697:2001).

In tali studi è stata utilizzata una soluzione detergente ecosostenibile (surfactanti di tipo ionico, 0.6%; anionico, 0.8%; enzimi, 0.02%) contenente l'1% di spore di batteri del genere *Bacillus* spp. appartenenti alle specie presenti nel sistema PCHS (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*). Superfici di vari materiali presenti in aree ospedaliere, quali ceramica, gomma, PVC e vetroresina, sono state dapprima contaminate con sospensioni di ceppi microbici standard ATCC (*American Type Culture Collection*) a concentrazione nota, includendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e successivamente trattate con la soluzione detergente a base di probiotici, diluita 1:100 in acqua (concentrazione operativa). Utilizzando piastre RODAC per il monitoraggio ambientale (*plate contact Rodac: Replicate Organism Detection and Counting*) specifiche per ciascun microrganismo, a diversi tempi post-applicazione è stata quindi determinata la carica batterica resi-

dua, dimostrando che l'applicazione del sistema PCHS determinava una netta inibizione della crescita dei patogeni su tutte le superfici testate [4].

Il sistema PCHS è stato poi sperimentato "in campo" in 3 diversi ospedali (Arcispedale Sant'Anna di Ferrara e Cona, Ospedale S. Giorgio di Ferrara, e Ospedale di Lockeren in Belgio), misurando la carica microbica residua dopo il trattamento con il metodo dell'applicazione di piastre Rodac. Nell'arco di 2 anni, sono stati raccolti e analizzati oltre 30.000 campioni microbiologici.

I risultati hanno mostrato che, rispetto all'impiego dei prodotti convenzionali (sanificanti chimici), il PCHS ha indotto un forte decremento della popolazione patogena, come riportato nelle successive Tabelle 1-5.

Riduzione % rispetto al T0			
Weeks	San Giorgio Hospital	Sant'Anna Hospital	AZ Lokeren
0	100	100	100
0.5			-23
1	-90	-69	-39
1.5			-52
2	-80	-80	-59
3	-94	-86	
4		-93	-58
5	-88	-74	
6	-99	-75	
7	-96		
8	-92		-63
11	-97		
12			-60
13	-96		
15	-98		
18			-64
20	-97		
24	-97		-60

Tabella 1 – Riduzione percentuale dovuta alla pulizia microbica sulla conta dei Coliformi sulle superfici degli Ospedali San Giorgio e Sant'Anna, a Ferrara, e AZ di Lokeren, in Belgio. Il controllo è rappresentato dal valore di contaminazione microbica superficiale all'inizio dei trial (settimana 0). Nel tempo, la riduzione media è stata di oltre il 74±21% per i Coliformi e del 89±18% per E. coli (Tabella 1). La riduzione osservata è risultata statisticamente significativa per tutte le strutture monitorate.

Riduzione % rispetto al T0			
Weeks	San Giorgio Hospital	Sant'Anna Hospital	AZ Lokeren
0	100	100	100
0.5			-26
1	-10	-50	-54
1.5			-73
2	-9	-59	-76
3	-29	-53	
4		-55	-81
5	-14	-43	
6	-84	-58	
7	-87		
8	-79		-83
11	-81		
12			-82
13	-78		
15	-95		
18			-86
20	-98		
24	-94		-88

Tabella 2 - Riduzione percentuale dovuta alla pulizia microbica sulla conta di *S. aureus* sulle superfici degli Ospedali San Giorgio, Sant'Anna ed AZ di Lokeren. Il controllo è rappresentato dal valore di contaminazione microbica superficiale all'inizio dei trial (settimana 0).

Nell'Ospedale San Giorgio in particolare, si è osservata una diminuzione di *Staphylococcus aureus* pari al 58±12% dopo 10 giorni e al 78±15% dopo 6 settimane di trattamento PCHS. La riduzione del patogeno è stata altamente significativa anche nelle altre strutture coinvolte nello studio (Tabella 2).

Riduzione % rispetto al T0	
Weeks	AZ Lokeren
0	100
0.5	-12
1	-37
1.5	-59
2	-57
3	
4	-71
5	
6	
7	
8	-49
11	
12	-67
13	
15	
18	-80
20	
24	-75

Tabella 3 - Riduzione percentuale dovuta alla pulizia microbica sulla conta di *C. difficile* sulle superfici degli Ospedali San Giorgio, Sant'Anna ed AZ di Lokeren. Il controllo è rappresentato dal valore di contaminazione microbica superficiale all'inizio dei trial (settimana 0).

Con una conta media vicina al limite di rilevamento dei protocolli sperimentali utilizzati, il *Clostridium difficile* rappresenta un comune, seppur meno abbondante, organismo correlato ad ICA. Tali microrganismi sono stati monitorati con regolarità solo nell'ospedale di Lokeren. Ulteriori misurazioni, proseguite per 24 settimane, hanno indicato che i livelli di *C. difficile* sulle superfici trattate con il sistema PCHS, sono diminuiti sino a scendere al di sotto dei limiti di rilevabilità del metodo di analisi (Tabella 3).

Riduzione % rispetto al T0		
Weeks	San Giorgio Hospital	Sant'Anna Hospital
0	100	100
0.5		
1	-95	-99
1.5		
2	-90	-98
3	-96	-99
4		-99
5	-92	-93
6	-96	-95
7	-90	
8	-96	
11	-90	
12		
13	-89	
15	-96	
18		
20	-99	
24	-96	

Tabella 4- Riduzione percentuale dovuta alla pulizia microbica sulla conta di *C. albicans* sulle superfici degli Ospedali San Giorgio, Sant'Anna ed AZ di Lokeren. Il controllo è rappresentato dal valore di contaminazione microbica superficiale all'inizio dei trial (settimana 0).

La carica di *Candida albicans* è stata misurata regolarmente nei due ospedali italiani. Il metodo PCHS ha determinato una rapida riduzione della carica, dell'82±19% dopo una sola settimana di applicazione, mantenuta stabile e al di sotto dei limiti di rilevamento dei protocolli sperimentali già dalla seconda settimana (Tabella 4).

Un successivo studio, condotto nel 2015 presso l'ospedale privato Quisisana di Ferrara, ha confermato i dati di riduzione della contaminazione superficiale precedentemente descritti, come mostrato in Tabella 5.

Microrganismo	Popolazione batterica				
	T0	T1	T2	T3	T4
<i>Staphylococcus spp.</i>	19789,47	3789,47	5157,89	7789,48	4210,53
<i>Staph. aureus</i>	5473,685	0,00	526,32	105,26	421,05
<i>Enterobacteriaceae</i>	0	1368,42	0,00	842,11	421,05
<i>Acinetobacter spp.</i>	0	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pseudomonas spp.</i>	0	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Clostridium difficile</i>	2105,26	0,00	0,00	0,00	105,26
<i>Candida spp.</i>	0	0,00	0,00	105,26	0,00
<i>Aspergillus spp.</i>	0	0,00	0,00	105,26	0,00

Tabella 5 – Effetto della pulizia probiotica sui microrganismi contaminati le superfici ospedaliere. I risultati sono espressi come valore del 75° percentile del conteggio delle CFU/m².

I dati di questo studio hanno inoltre mostrato che i ceppi di *Bacillus* presenti nel Sistema PCHS erano in grado di colonizzare le superfici, arrivando a rappresentare una percentuale pari al 70% del microbiota totale rilevabile già dopo un solo mese dall'inizio del trattamento, confermando che queste specie batteriche sono effettivamente in grado di contrastare la ricontaminazione da parte dei patogeni in quanto capaci di sostituirsi gradualmente alla popolazione contaminante [5].

Microbiota di superficie e rimodulazione del resistoma

Oltre all'impatto sul grado di contaminazione superficiale, si è voluto valutare e quantificare l'impatto del PCHS sulla popolazione farmaco-resistente, allo scopo di evidenziare l'eventuale rischio di selezione di patogeni dotati di resistenza (come accade nell'uso dei disinfettanti chimici). A questo scopo è stato analizzato il resistoma della popolazione contaminante, ossia la presenza di tutti i geni conferenti resistenze ad antibiotico nella popolazione microbica indagata, e la sua modulazione nel tempo dopo l'introduzione del sistema PCHS. Dalle analisi molecolari effettuate mediante qPCR microarray, è stato possibile constatare una fortissima diminuzione della presenza dei geni codificanti le resistenze agli antibiotici, rispetto al tempo di inizio sperimentazione (T0), come riportato nella Tabella 6.

In generale tutti i geni codificanti resistenza sono risultati diminuiti (50-99.92%), con un decremento particolarmente evidente nei geni codificanti la resistenza alla meticillina (*mecA*) associati alla presenza di *Staphylococcus spp.* (*S. aureus*, *spa*), confermando che il sistema PCHS non solo non induce selezione di specie resistenti, ma anzi causa un forte decremento delle stesse sulle superfici ospedaliere.

<u>Geni di resistenza</u>	<u>Riduzione percentuale rispetto al T0</u>			
	<u>T1</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T4</u>
<u>AAC(6)-Ib-cr</u>	<u>70,50</u>	<u>52,61</u>	<u>82,58</u>	<u>71,83</u>
<u>IMI & NMC-A</u>	<u>66,44</u>	<u>87,41</u>	<u>80,66</u>	<u>80,66</u>
<u>SHV(156D)</u>	<u>50,00</u>	<u>76,13</u>	<u>63,24</u>	<u>63,50</u>
<u>SHV(156G)</u>	<u>50,00</u>	<u>76,13</u>	<u>63,24</u>	<u>63,50</u>
<u>SHV(238G240E)</u>	<u>50,00</u>	<u>76,13</u>	<u>63,24</u>	<u>63,50</u>
<u>SHV(238G240K)</u>	<u>50,00</u>	<u>76,13</u>	<u>63,24</u>	<u>63,50</u>
<u>SHV(238S240E)</u>	<u>50,00</u>	<u>76,13</u>	<u>63,24</u>	<u>63,50</u>
<u>SHV(238S240K)</u>	<u>50,00</u>	<u>76,13</u>	<u>63,24</u>	<u>63,50</u>
<u>ccrA</u>	<u>68,85</u>	<u>88,32</u>	<u>82,01</u>	<u>82,05</u>
<u>VIM-1 group</u>	<u>82,39</u>	<u>93,45</u>	<u>90,23</u>	<u>89,95</u>
<u>VIM-13</u>	<u>73,19</u>	<u>90,38</u>	<u>85,21</u>	<u>85,23</u>
<u>MOX</u>	<u>56,14</u>	<u>83,50</u>	<u>74,62</u>	<u>74,68</u>
<u>OXA-50 Group</u>	<u>70,76</u>	<u>88,62</u>	<u>83,31</u>	<u>83,33</u>
<u>OXA-51 Group</u>	<u>50,00</u>	<u>64,91</u>	<u>67,43</u>	<u>67,00</u>
<u>ermA</u>	<u>80,84</u>	<u>99,11</u>	<u>88,81</u>	<u>87,98</u>
<u>ermB</u>	<u>87,37</u>	<u>75,55</u>	<u>99,17</u>	<u>95,02</u>
<u>ermC</u>	<u>76,96</u>	<u>93,92</u>	<u>45,05</u>	<u>92,34</u>
<u>mefA</u>	<u>96,52</u>	<u>98,15</u>	<u>99,03</u>	<u>98,99</u>
<u>msrA *</u>	<u>+70,67</u>	<u>+11,50</u>	<u>+61,98</u>	<u>+28,57</u>
<u>oprm</u>	<u>54,95</u>	<u>83,05</u>	<u>73,96</u>	<u>73,96</u>
<u>tetB</u>	<u>57,81</u>	<u>66,22</u>	<u>75,67</u>	<u>75,67</u>
<u>mecA</u>	<u>85,40</u>	<u>91,32</u>	<u>90,27</u>	<u>94,29</u>
<u>S. aureus</u>	<u>99,92</u>	<u>95,90</u>	<u>98,87</u>	<u>99,54</u>
<u>spa</u>	<u>99,89</u>	<u>99,75</u>	<u>99,54</u>	<u>99,80</u>

*Questo è l'unico gene per il quale non ci può essere diminuzione in quanto è presente nei ceppi di *Bacillus* PCHS

Tabella 6 - Riduzione dei geni di resistenza agli antibiotici R presenti nel microbiota di superficie a seguito dell'introduzione della pulizia a base di *Bacillus* nei vari tempi di campionamento rispetto al tempo iniziale T0, quando è stato usato un protocollo di tipo tradizionale. Il gene *msrA* fa eccezione, aumentando leggermente in tutti i tempi testati. Questo risultato era comunque atteso, proprio per la presenza di una resistenza *mrsA* cromosomica costitutiva tipica delle specie di *Bacillus*.

Analisi sulla biosicurezza del *Bacillus*

Per quanto riguarda gli aspetti legati alla sicurezza di impiego dei ceppi di *Bacillus* presenti nel sistema di sanificazione PCHS, questi sono stati studiati nell'arco di un periodo di circa 4 anni, in 7 strutture ospedaliere trattate in modo continuativo con tale sistema di sanificazione [5, 9].

Da un lato sono stati condotti studi per testare la stabilità genetica dei *Bacillus* del PCHS. Ciò al fine di verificare che i *Bacillus* non acquisissero nuovi caratteri di resistenza dai patogeni con i quali si trovano a contatto sulle superfici trattate. A tale scopo sono stati isolati i *Bacillus* dalle superfici trattate fino a 4 anni consecutivi, per analizzarli mediante metodiche molecolari. Ogni ceppo isolato è stato caratterizzato mediante PCR seguita da sequenziamento, al fine di identificare i *Bacillus* del PCHS e distinguerli dai *Bacillus* ambientali. Una volta identificati, i *Bacillus* sono poi stati saggiati per la presenza dei geni di resistenza agli antibiotici, utilizzando una metodica in qPCR microarray in grado di evidenziare simultaneamente la presenza di oltre 80 geni codificanti resistenza. In tutti gli isolati testati non è mai stata evidenziata l'acquisizione di nuovi geni di resistenza, mostrando che i *Bacillus* PCHS sono geneticamente molto stabili e che l'uso di spore di *Bacillus* in prodotti pulenti può essere considerato sicuro per la salute [6].

In parallelo, è stata analizzata la capacità infettiva dei *Bacillus* del PCHS nei pazienti ospedalizzati.

A questo scopo, è stata implementata una sorveglianza microbiologica in modo da analizzare tutti i campioni biologici provenienti da pazienti ospedalizzati nelle strutture trattate per la presenza di *Bacillus*. Oltre 32000 campioni biologici (includendo sangue, urine, espettorati, biopsie, ecc) sono stati analizzati con metodiche di microbiologia convenzionale nell'arco di 4 anni. I risultati hanno mostrato la totale assenza di *Bacillus* in tutti i campioni testati, sottolineando come questi batteri non abbiano la capacità di infettare i soggetti esposti, anche quando si tratta di pazienti ospedalizzati, defedati e pertanto particolarmente suscettibili ad infezioni di ogni tipo.

Inoltre, alcuni pazienti sono stati testati utilizzando i metodi di indagine molecolare (PCR e qPCR), dotati di estrema sensibilità. Anche con questa metodica nessun campione è risultato positivo, a conferma della incapacità dei *Bacillus* PCHS di causare infezioni nel paziente ospedalizzato.

Conclusioni

Alla luce delle indagini effettuate in diverse strutture ospedaliere il Sistema PCHS può rappresentare un'alternativa efficace e sicura rispetto all'impiego dei detergenti chimici, per i seguenti motivi:

- 1) Il miglioramento del livello di igiene, inteso come assenza di microrganismi patogeni, per il paziente, aumenta in modo statisticamente significativo.
- 2) L'effetto perdura nel tempo, a differenza dei prodotti chimici tradizionali, a causa del fatto che le specie di *Bacillus*, oltre ad essere sporigene, creano un microbiota stabile che compete continuamente con la carica dei patogeni nosocomiali.
- 3) La comprovata apatogenicità dei *Bacillus* impiegati nel sistema PCHS li rende ideali per l'impiego in ambienti di degenza ospedaliera.
- 4) Il sistema PCHS contribuisce ad una forte compressione delle antibiotico-resistenze nelle specie batteriche responsabili di ICA, riducendo attivamente la presenza di patogeni multiresistenti.

Sono in corso studi per verificare il fatto che l'impiego del PCHS contribuisca attivamente all'abbattimento del numero di ICA [6], per la rimodulazione del microbiota ospedaliero e perciò potenzialmente eliminando gli agenti infettivi causanti tali patologie. Questo ultimo punto merita certamente ulteriori approfondimenti ed offre sicuramente spunti interessanti per future ricerche.

Bibliografia

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals*. Protocol version 4.3. Full-scale survey and codebook. Stockholm: ECDC: 2012. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/HAI/about_HAI-Net/Pages/PPS.aspx
2. WHO. *Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide*. World Health Organization, 2011.
3. Gattuso G. et al. "Effetti del monitoraggio sistemico sulla prevenzione delle infezioni ospedaliere: la sorveglianza basata sui dati del Laboratorio di Microbiologia". *Giornale Italiano di Nefrologia*, n.24 S-38, 2007 /pp. S33-S38.
4. Vandini A. et al. "Hard Surface Biocontrol in Hospitals Using Microbial-Based Cleaning Products". *PLoS ONE* 2014 Sep 26;9(9):e108598. doi: 10.1371/journal.pone.0108598.
5. Caselli E. 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 Feb 17;11(2):e0148857. doi: 10.1371/journal.pone.0148857.
6. Caselli E. et al. "Influence of Sanitizing Methods on Healthcare-Associated Infections Onset: A Multicentre, Randomized, Controlled Pre-Post Interventional Study". Study Protocol Published Date: Oct 28, 2016.
7. Mazzacane S. et al. "La sanificazione delle degenze ospedaliere: nuove strategie per la riduzione delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria". ANMDO. Settembre 2015.
8. La Fauci V. et al. "An Innovative Approach to Hospital Sanitization Using Probiotics: In Vitro and Field Trials". *J Microb Biochem Technol* 2015, 7:3.
9. Caselli E. et al. "Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation", *Journal of Hospital Infection* Volume 94, Issue 2, October 2016, Pages 193–194.
10. Al-Ghalith G.A. & Knights D. "Bygiene: the new paradigm of bidirectional hygiene." *Yale J Biol Med* 2015;88:359-365.
11. WHO. *Guidelines on Core Components of Infection Prevention and Control Programs at the National and Acute Health Care Facility Level*, WHO 2016.
12. WHO. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotic*", WHO, Geneva, 27 February 2017.
13. Falagas ME, Makris GC (2009), "Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis", *J Hosp Infect* 71: 301–306.
14. Weber D. et alii, "In vitro susceptibility of Bacillus spp. to selected antimicrobial agents", *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, May 1988, p.642-645.