



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

RIDUZIONE DELL'INCIDENZA DI INFEZIONI CORRELATE ALL'ASSISTENZA MEDIANTE UN SISTEMA DI SANIFICAZIONE A BASE DI PROBIOTICI: RISULTATI DI UNO STUDIO DI INTERVENTO PROSPETTICO MULTICENTRICO.¹

Elisabetta Caselli^{1,2,*}, Silvio Brusaferrò³, Maddalena Coccagna², Luca Arnoldo³, Filippo Berloco⁴, Paola Antonioli⁵, Rosanna Tarricone⁶, Gabriele Pelissero⁷, Silvano Nola⁸, Vincenza La Fauci⁹, Alessandro Conte³, Lorenzo Tognon¹⁰, Giovanni Villone¹¹, Nelso Trua¹², Sante Mazzacane², per il gruppo di studio SAN-ICA¹⁻¹².

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

²*CIAS Centro di Ricerche Interdipartimentale, Dipartimento di Scienze Mediche e Architettura, Università di Ferrara, Ferrara, Italia*

³*Dipartimento di Medicina, Università di Udine, Udine, Italia*

⁴*Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma, Italia*

⁵*Dipartimento di Controllo e Prevenzione delle Infezioni e Gestione del Rischio, S. Anna University Hospital, Ferrara, Italia*

⁶*Centre for Research on Health and Social Care Management (CERGAS), Dipartimento di Analisi delle Politiche e Gestione Pubblica, Università Bocconi, Milano, Italia*

⁷*Dipartimento di Salute Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia, Pavia, Italia*

⁸*Azienda USL di Ferrara, Ferrara, Italia*

⁹*Dipartimento di Scienze Biomediche e imaging Dentale e Funzionale, Università di Messina, Messina, Italia*

¹⁰*Ospedale di Santa Maria del Prato, Feltre (Belluno), Italia*

¹¹*Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedali Riuniti di Foggia, Foggia, Italia*

¹²*Ospedale Sant'Antonio Abate, Tolmezzo (Udine), Italia*

¹Traduzione dell'articolo: Caselli E, Brusaferrò S, Coccagna M, Arnoldo L, Berloco F, Antonioli P, Tarricone R, Pelissero G, Nola S, La Fauci V, Conte A, Tognon L, Villone G, Trua N, Mazzacane S et al (2018) Reducing healthcare-associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: A multicentre, prospective, intervention study PLoS ONE 13(7): e0199616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616>



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

Riassunto

Le infezioni correlate all'assistenza (ICA) rappresentano un problema globale, ulteriormente aggravato dall'aumento di patogeni ICA-associati resistenti agli antibiotici. D'altro canto, la persistente contaminazione delle superfici ospedaliere contribuisce alla trasmissione delle ICA, non essendo controllata in modo efficiente dai metodi di pulizia convenzionale, i quali non prevengono la ricontaminazione, hanno un elevato impatto ambientale e possono favorire la selezione di ceppi microbici farmaco-resistenti. Nella ricerca di approcci efficienti, un sistema di pulizia ecosostenibile a base di probiotici (Probiotic Cleaning Hygiene System, PCHS) si è recentemente dimostrato in grado di abbattere i patogeni sulla superficie senza selezionare specie farmaco-resistenti. Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare l'impatto del sistema PCHS sull'incidenza delle ICA.

È stato eseguito uno studio multicentrico pre-post intervento, della durata di 18 mesi, in reparti di Medicina Interna di 6 ospedali pubblici italiani (1° Gennaio 2016 - 30 Giugno 2017). L'intervento è consistito unicamente nella sostituzione della sanificazione convenzionale con il PCHS, mantenendo inalterata qualsiasi altra procedura in grado di influenzare il controllo delle ICA. Il principale outcome dello studio è stato rappresentato dalla incidenza delle ICA nei periodi pre e post intervento. In parallelo è stata analizzata la contaminazione delle superfici. Nel complesso, sono stati analizzati 11,842 pazienti e 24,875 campioni ambientali. L'uso del PCHS è risultato associato ad un significativo decremento dell'incidenza globale delle ICA, dal 4.8% (284 pazienti con ICA su 5.930 pazienti totali) al 2.3% (128 pazienti con ICA su 5.531 pazienti totali) (OR=0.44, IC 95% 0.35-0.54) (P<0.0001). Contemporaneamente, il PCHS era associato ad un decremento stabile dei patogeni sulle superfici, rispetto alla sanificazione convenzionale (calo medio dell'83%, range 70-96%), accompagnato da un simultaneo decremento fino a 2 logaritmi dei geni di antibiotico-resistenza del microbiota (P<0.0001; Pc=0.008). Il nostro studio fornisce dati che supportano l'influenza di una procedura di sanificazione sull'incidenza delle ICA, mostrando che un singolo intervento ambientale a base di probiotici può essere associato ad un significativo decremento del rischio di contrarre un'ICA durante il ricovero. Una volta confermato in indagini più ampie e su altre popolazioni bersaglio, questo approccio eco-sostenibile potrebbe essere considerato come parte di strategie di controllo e prevenzione delle infezioni (IPC).

Registrazione dello studio - ISRCTN International Clinical Trials Registry, ISRCTN58986947



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

Introduzione

Le infezioni correlate all'assistenza (ICA) rappresentano un problema globale che coinvolge fino al 15% di tutti i pazienti ospedalizzati nel mondo (1). In Europa, circa 3.2 milioni di pazienti acquisiscono un'ICA ogni anno, e 37.000 muoiono come diretta conseguenza di tali infezioni, anche a causa dell'aumento di patogeni multiresistenti ad antibiotico (multi-drug resistant, MDR) associati alle ICA (1,2). Studi condotti in ospedali italiani mostrano un'incidenza del 5-10% con un tasso di mortalità fino al 20-30% (3-5).

D'altro canto, è noto che le superfici ospedaliere sono persistentemente contaminate da molti microrganismi che possono contribuire alla trasmissione delle ICA (6-11), in quanto le superfici rappresentano il serbatoio dei patogeni diffusi dai pazienti ospedalizzati e dal personale sanitario (6,8,10-15).

Il controllo della contaminazione superficiale è stato finora realizzato mediante sanificazione convenzionale a base di sostanze chimiche, la quale però mostra dei limiti, poiché non può prevenire il fenomeno della ricontaminazione (16-19), ha un elevato impatto ambientale, e può contribuire alla selezione di patogeni resistenti ai disinfettanti stessi e anche agli antibiotici (20,21), contribuendo potenzialmente ad un ulteriore aumento dei patogeni MDR associati ad ICA (22,23).

Recentemente, il concetto di "salute" delle superfici ospedaliere è stato ripensato utilizzando l'approccio usato per la salute del corpo umano, dove si è osservato che, piuttosto che eradicare tutti i patogeni, la loro sostituzione da parte di microrganismi buoni può essere più efficace nel prevenire le infezioni (24, 25). In questa direzione, è stato recentemente studiato un approccio di sanificazione basato su detergenti contenenti spore di batteri probiotici del genere *Bacillus* (Probiotic Cleaning Hygiene System, PCHS), mostrando che è sicuro per i pazienti ospedalizzati (26), può diminuire in modo stabile i patogeni superficiali fino al 90% in più dei disinfettanti convenzionali (27,28), e che non seleziona ceppi resistenti ad antibiotico, ma piuttosto li riduce (29) senza incrementare i costi della sanificazione (27,30).

Essendo la riduzione delle ICA l'obiettivo finale di ogni procedura di sanificazione, il nostro scopo è stato quello di analizzare l'impatto diretto del metodo PCHS sull'incidenza delle ICA, mediante uno studio di intervento multicentrico della durata di 18 mesi (dal 1° Gennaio 2016 al 30 Giugno



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

2017) in 6 ospedali italiani, per verificare se l'uso di una procedura di pulizia innovativa ecosostenibile a base microbica possa direttamente influenzare lo sviluppo di ICA.

Metodi

Disegno dello studio e partecipanti

Abbiamo condotto uno studio multicentrico, prospettico, di tipo pre-post intervento, analizzando simultaneamente la contaminazione superficiale e l'incidenza delle ICA in 6 ospedali pubblici italiani di medie e grandi dimensioni, per 18 mesi (dal 1° Gennaio 2016 al 30 Giugno 2017). Il protocollo della sperimentazione è stato approvato dai Comitati Etici di ogni struttura sanitaria coinvolta. Il protocollo è stato registrato nel ISRCTN Registry (ISRCTN58986947).

I criteri di idoneità per gli ospedali arruolati includevano: i) l'approvazione del comitato etico locale prima dell'entrata nell'indagine, ii) la presenza di reparti di medicina interna/geriatria e neurologia (inclusi nello studio), iii) dimensioni superiori a 100 letti di degenza, iv) presenza di un definito programma di sorveglianza delle ICA e di un team di controllo delle infezioni, v) accordo di non introdurre alcun nuovo intervento incentrato sulla Prevenzione e Controllo dell'Infezione (ICP), potenzialmente in grado di influenzare l'incidenza delle ICA, eccetto quelli già esistenti nei reparti ospedalieri coinvolti e quelli necessari per controllare possibili epidemie, nel corso dell'intero studio.

Gli ospedali arruolati rappresentavano diverse regioni geografiche italiane (Nord, Centro e Sud), e sono stati collocati in modo randomizzato in uno dei due gruppi di intervento (I_1 , I_2). Un ulteriore ospedale è stato incluso come controllo esterno ($_{ext}C$), in quanto non ha ricevuto l'intervento ed è stato solo monitorato per l'incidenza delle ICA e la contaminazione ambientale. Il gruppo I_1 includeva 3 ospedali nei quali lo studio è iniziato il 1° Gennaio 2016 (Feltre, Roma, Foggia); il gruppo I_2 includeva 2 ospedali in cui lo studio è iniziato 5 mesi dopo, il 1° Maggio 2016 (Vigevano e Tolmezzo); l'ospedale $_{ext}C$ è stato monitorato a partire dal 1° Maggio 2016 (Messina). La collocazione casuale nei gruppi di studio è stata effettuata da uno sperimentatore indipendente usando numeri casuali generati da un computer.

L'intervento è consistito unicamente nell'introduzione della sanificazione con PCHS (un sistema brevettato di Copma, ferrara, Italia), che ha sostituito quella chimica convenzionale (prodotti a base



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

di cloro). Gli ospedali inclusi hanno accettato di non introdurre alcun altro intervento potenzialmente in grado di influenzare l'incidenza delle ICA durante l'intero studio, ad eccezione di quelli esistenti già al momento dell'arruolamento. Il personale addetto alle pulizie non è cambiato durante l'indagine ed è stato adeguatamente addestrato per l'appropriata applicazione del PCHS in tutti gli ospedali riceventi l'intervento. Più precisamente, non sono stati affrontati temi di pulizia generale, in quanto la formazione si è limitata alle modalità corrette per preparare ed usare i detergenti PCHS. Non è stata introdotta nessun'altra variazione, né in termini di numero e di qualifiche del personale addetto alle pulizie, né nella frequenza delle procedure, per cui il personale addetto alle pulizie, il personale sanitario e i pazienti non hanno avuto alcuna percezione diversa riguardante la sostituzione del sistema di pulizia. Il personale sanitario e i pazienti non erano a conoscenza del cambiamento del sistema di pulizia.

Lo studio ha previsto due fasi: un periodo di pre-intervento di 6 mesi (pre-PCHS), durante i quali gli ospedali hanno mantenuto le procedure di sanificazione convenzionali basate su prodotti chimici, e un periodo di intervento di 6 mesi (post-PCHS), durante il quale il PCHS è stato applicato quotidianamente, con un intervallo minimo di 2 mesi tra le due fasi, coincidente con l'introduzione del PCHS.

Tutti i nuovi pazienti ricoverati nei reparti coinvolti nei periodi pre-PCHS e PCHS sono stati inclusi nello studio, e sorvegliati per lo sviluppo di ICA, senza distinzione di età o genere, e mantenendo la loro identità completamente anonima; in tal modo non è stato necessario raccogliergli il consenso informato. La sorveglianza sulle ICA era già presente in tutti gli ospedali arruolati, e non specificamente attivata per questo studio, ma durante lo studio è stata effettuata in continuum, per ottenere un reale valore di incidenza. I pazienti già presenti all'inizio dei periodi pre-PCHS e PCHS, e nel periodo finestra tra le fasi pre-PCHS e PCHS sono stati esclusi. L'osservazione dei pazienti è stata fermata l'ultimo giorno dei periodi pre-PCHS e PCHS.

Analisi delle ICA

Ogni ICA verificatasi durante i periodi di osservazione nei pazienti ricoverati nei reparti ospedalieri coinvolti nei due periodi è stata identificata in accordo ai criteri definiti dal Centro Europeo del controllo e della prevenzione delle malattie (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC). Tutte le tipologie di ICA sono state incluse nello studio, e cioè: infezioni del tratto urinario



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

(urinary tract infections, UTI), infezioni del sangue (bloodstream infections, BSI) incluse quelle associate al catetere vascolare centrale (CVC), sepsi cliniche sistemiche, infezioni gastrointestinali (gastrointestinal infections, GI), infezioni della pelle e dei tessuti molli, polmoniti, infezioni del tratto respiratorio inferiore, tratto riproduttivo, infezioni di occhi, orecchie, naso e gola o bocca (eye, ear, nose and throat or mouth, EENT), infezioni del midollo e delle articolazioni, infezioni intra-addominali, e infezioni non specificate.

Gli agenti eziologici delle ICA sono stati identificati dai laboratori di microbiologia di ogni ospedale, sulla base di test diagnostici di routine. Non sono state apportate modifiche al processo diagnostico convenzionale di ciascun ospedale, ad eccezione dell'implementazione di una sorveglianza microbiologica per il *Bacilli*, che è stata effettuata regolarmente in tutti i campioni clinici.

Campionamento ambientale e analisi

Il microbiota delle superfici ospedaliere è stato analizzato mensilmente da un team centrale (Centro CIAS, Università di Ferrara). A questo scopo tre punti rappresentativi (pavimento, pediera e lavello) di 3-6 stanze randomizzate per ogni ospedale (a seconda che il numero dei letti nei reparti arruolati fosse meno o più di 100) sono stati campionati come descritto precedentemente (27,29).

I batteri totali, *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* spp., *Acinetobacter* spp., *Mycetes*, *Pseudomonas* spp., and *Clostridium difficile* sono stati enumerati mediante conta su specifiche piastre da contatto Rodac (CFU/ m²).

Trimestralmente (due volte nelle fasi pre-PCHS, e due nelle fasi post-PCHS) gli stessi punti sono stati analizzati anche mediante saggi molecolari, come descritto precedentemente (29). Brevemente, la quantità totale batterica, la quota di *Bacillus* e il resistoma del microbiota sono stati rispettivamente quantificati mediante real time PCR quantitativa *panB* (*panB*-qPCR), *spo0A*-qPCR e qPCR-microarray per 84 geni di resistenze (Qiagen Antibiotic Resistance Genes, BAID-1901ZRA, Hilden, Germany). Il resistoma è stato anche analizzato in 4 isolati di *Bacillus* da PCHS provenienti da ogni singola campagna di campionamento della fase PCHS.



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

Raccolta e gestione dei dati

Personale sanitario specifico per ogni ospedale (selezionato e formato in modo standard) ha raccolto *in continuum* i dati dei pazienti su apposite cartelle cliniche elettroniche. I professionisti addetti alla raccolta dati erano soltanto a conoscenza dell'esistenza di uno studio di incidenza da condurre per la durata dell'intero studio (18 mesi), e non erano a conoscenza del gruppo di appartenenza dell'ospedale e del momento dell'applicazione dell'intervento di pulizia.

Per ogni paziente ricoverato è stata compilata una prima cartella clinica elettronica, contenente i dati generali: sesso, età, provenienza, data di ammissione, causa di ammissione, presenza di fattori di rischio specifici, terapia antibiotica nelle due settimane precedenti l'ammissione, presenza di colonizzazione da parte di microrganismi *alert*, eventuale presenza di infezioni al momento dell'ammissione e del suo agente eziologico.

Una seconda cartella, compilata in caso di sviluppo di ICA, comprendeva invece le informazioni sull'insorgenza dell'infezione, l'ubicazione, l'agente eziologico, la terapia farmacologica e la risoluzione/esito dell'infezione. Tutti i dati sono stati resi anonimi e trasmessi centralmente tramite un sito web sicuro e protetto da password. Durante l'intero periodo di studio, è stato disponibile un team centrale per risolvere problemi informatici, standardizzando e convalidando la completezza e la consistenza dei dati. Gli analizzatori di dati non erano a conoscenza della fase di intervento e del gruppo degli ospedali. Una quota corrispondente ad almeno 10 ICA registrati per ambiente ospedaliero è stata convalidata da un secondo esperto incluso nello studio, in cieco, per ridurre al minimo il rischio di errori di codifica dell'infezione.

I dati relativi alla contaminazione ambientale, raccolti mensilmente dal team centrale (Università di Ferrara), sono stati caricati nello stesso sito web protetto da password.

Misura degli obiettivi

Il principale obiettivo dello studio era la riduzione dell'incidenza delle ICA nella fase PCHS rispetto alla fase pre-PCHS. Le variazioni nei tassi di infezione sono state analizzate sia come incidenza cumulativa per 100 pazienti ricoverati, sia come tassi di incidenza delle ICA per 1000 giorni-paziente. Un secondo obiettivo era la caratterizzazione qualitativa e quantitativa della contaminazione superficiale ospedaliera nelle aree oggetto di indagine.



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

Metodi statistici

La potenza dello studio è stata stimata sulla base dei ricoveri e dei tassi di incidenza delle ICA negli ospedali italiani (3-5). La dimensione del campione è stata calcolata considerando una potenza dell'80%, per rilevare una riduzione dell'incidenza dell'infezione di almeno il 25% a partire da un tasso ipotetico del 4% assumendo un test bilaterale con un livello alfa di 0.05, e corrispondeva a 10,476 pazienti.

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test del χ^2 , il test Kolmogorov-Smirnov per la valutazione della normalità, test parametrici (test *t* di Student) e non parametrici (Mann-Whitney), test Chi-quadro di associazione, e analisi multivariata (regressione logistica), assumendo come statisticamente significativo un valore di *P* almeno <0.05. E' stato sviluppato un modello multivariato che includeva tutti i parametri che mostravano una correlazione statisticamente significativa con la presenza di ICA attraverso l'analisi univariata. Per l'analisi dei dati dei microarray è stata applicata la correzione Bonferroni per confronti multipli (si è ritenuto significativo un valore $P_c < 0.05$). Le analisi sono state eseguite utilizzando il software IBM® SPSS20® Statistics (IBM, Bologna, Italia).

Reclutamento

Tutte le strutture coinvolte hanno completato lo studio, garantendo un monitoraggio continuo per un periodo di 6 mesi nella fase pre-intervento (pre-PCHS) e un periodo di 6 mesi nella fase post-intervento (PCHS) (Fig.1). Complessivamente, lo studio ha esaminato 11,842 pazienti, di cui 11,461 provenienti dagli ospedali di intervento I₁ e I₂, e 381 dall'ospedale di controllo esterno (Tabella 1). Complessivamente sono stati analizzati 24,875 campioni ambientali.

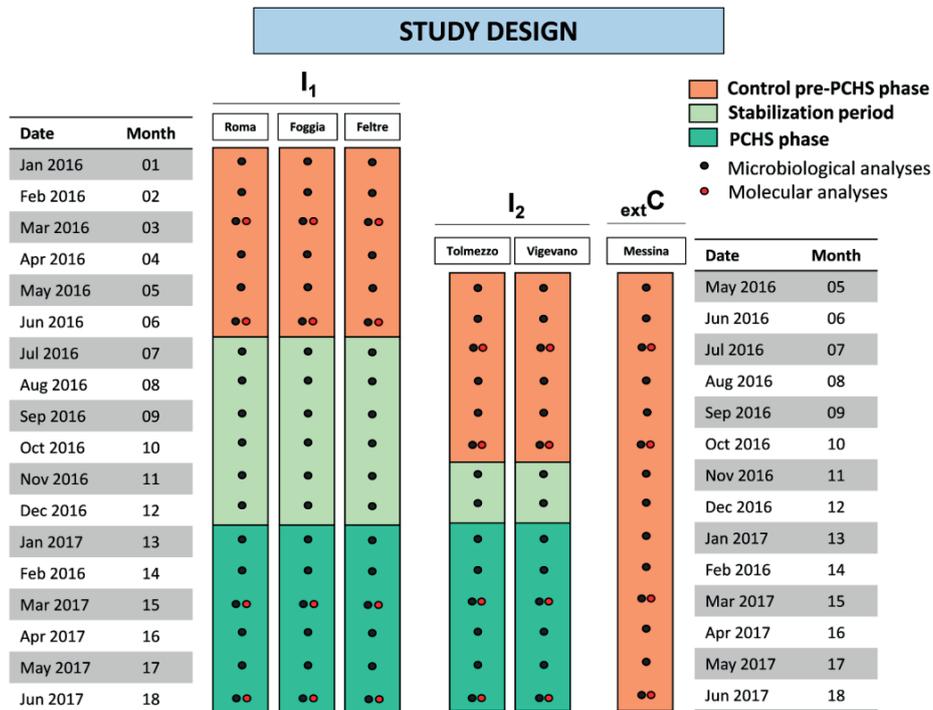


Fig1. Rappresentazione grafica del disegno dello studio. Sei ospedali italiani di diverse aree geografiche sono stati arruolati nello studio (Nord: Feltre, Tolmezzo, Vigevano; Centro: Roma; Sud: Foggia, Messina). Cinque ospedali sono stati collocati in modo randomizzato in 2 gruppi d'intervento (I₁, I₂) e un altro ospedale ha rappresentato un controllo esterno (extC): il gruppo I₁ comprendeva gli ospedali di Roma, Foggia e Feltre, entrati nello studio il 1° gennaio 2016; il gruppo I₂ comprendeva gli ospedali di Vigevano e Tolmezzo, entrati 5 mesi dopo, il 1° maggio 2016; l'ospedale extC era rappresentato dall'ospedale di Messina, che non ha ricevuto alcun intervento ed è stato unicamente monitorato, a partire dal 1° maggio 2016. Le fasi delle indagini sono indicate per colori: arancione, periodo di pre-intervento di 6 mesi (prima del PCHS); verde chiaro, periodo di stabilizzazione, quando il PCHS è stato introdotto; verde, periodo di post-intervento di 6 mesi (PCHS), quando il PCHS è stato quotidianamente applicato. Le campagne di campionamento per le analisi microbiologiche sono indicate dai cerchi: le analisi microbiologiche convenzionali sono state eseguite mensilmente (cerchi neri), e le analisi molecolari sono state eseguite trimestralmente (cerchi rossi) in tutti gli ospedali iscritti.

Risultati

Impatto della sanificazione sull'incidenza delle ICA

Globalmente, 11,842 pazienti sono stati analizzati, tutti ospedalizzati nei reparti di medicina Interna degli ospedali arruolati, ciò per analizzare l'incidenza di ICA in un campione di pazienti più omogeneo possibile.



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

La Tabella 1 riassume le principali caratteristiche della popolazione studiata per ciascun ospedale incluso nello studio. L'incidenza cumulativa delle ICA (pazienti ICA-positivi/pazienti arruolati) è diminuita significativamente nella fase PCHS rispetto alla fase pre-PCHS, negli ospedali I₁-I₂, diminuendo dal 4.8% (283/5,930) al 2.3% (128/5,531) (range 1.3-3.7%)($P < 0.0001$), indipendentemente dalla posizione geografica degli ospedali e dalla data di partenza dello studio. Il tasso di incidenza delle ICA per 1,000 giorni-paziente è diminuito da 5.4 (314/57,742) a 2,3 (141/58,201), con un valore di incidenza di 0.45 (95% IC, 0.36-0.54). La diminuzione è stata evidenziata in ogni singolo ospedale, compresa la struttura con una incidenza iniziale di ICA molto bassa (Tolmezzo, dal 2.1% all'1.7%). Una lieve riduzione non significativa è stata osservata anche nell'ospedale di controllo esterno, dove il numero totale di ICA è stato di 15 su 12 pazienti nel primo semestre e di 16 su 16 pazienti nel secondo, con un tasso di incidenza di 8.2% e 6.8% (OR=0.82; 95% IC, 0.37-1.78; $P=0.6$), a un tasso di incidenza relativa per 1.000 giorni-paziente corrispondente rispettivamente a 9.4 (15/1,600) e 7.0 (16/2,279) (OR=0.75; 95% IC,0.37-1.54).

Tabella 1- Caratteristiche della popolazione di partecipanti allo studio nelle fasi pre-PCHS e PCHS, suddivise per gli ospedali coinvolti.

Gruppo	Struttura sanitaria	Pazienti No.			Età (media±DS)		Durata del ricovero (media±DS)		Pazienti con almeno un'ICA No. (%)			Significatività statistica
		Totale	Pre-PCHS	PCHS	Pre-PCHS	PCHS	Pre-PCHS	PCHS	Pre-PCHS	PCHS		
I ₁	Feltre	2,812	1,599	1,213	73.1±16.4	74.9±15.4	8.7±5.7	10.0±6.1	77 (4.8%)	30 (2.5%)	P=0.0013 OR, 0.50 95% IC, 0.33-0.77	
	Foggia	1,951	966	985	72.4±15.9	74.7±14.8	9.9±5.4	12.0±7.1	106 (11.0%)	36 (3.7%)	P<0.0001 OR, 0.31 95% IC, 0.21-0.45	
	Roma	3,116	1,611	1,505	68.0±17.8	68.1±17.2	10.4±8.9	11.0±7.3	50 (3.1%)	20 (1.3%)	P=0.0008 OR, 0.42 95% IC, 0.25-0.71	
I ₂	Tolmezzo	2,453	1,186	1,267	74.3±14.3	75.9±13.3	10.6±9.8	9.8±6.3	25 (2.1%)	21 (1.7%)	P=0.4111 OR, 0.78 95% IC, 0.44-1.41	
	Vigevano	1,129	568	561	72.7±15.5	72.6±16.1	8.9±5.4	9.6±6.2	26 (4.6%)	21 (3.7%)	P=0.4829 OR, 0.81 95% IC, 0.45-1.46	
Tot. (I ₁ +I ₂)		11,461	5,930	5,531	71.8±16.4	73.0±15.8	9.7±7.6	10.5±6.7	284 (4.8%)	128 (2.3%)	P<0.0001 OR, 0.47 95% IC, 0.38-0.58	
extC	Messina	381	146	235	71.3±14.9	72.3±15.7	11.6±8.9	9.7±5.7	12 (8.2%)	16 (6.8%)	P=0.6080 OR, 0.82 95% IC, 0.37-1.78	

I₁, Gruppo di intervento 1; I₂, Gruppo di intervento 2; extC, ospedale di controllo esterno.

L'analisi dei tassi bimestrali di incidenza delle ICA nelle fasi pre-PCHS e PCHS non ha mostrato alcuna tendenza alla diminuzione nel periodo pre-PCHS, prima dell'intervento, mentre una riduzione stabile è stata osservata a seguito dell'introduzione del sistema di sanificazione con PCHS (Fig. 2).

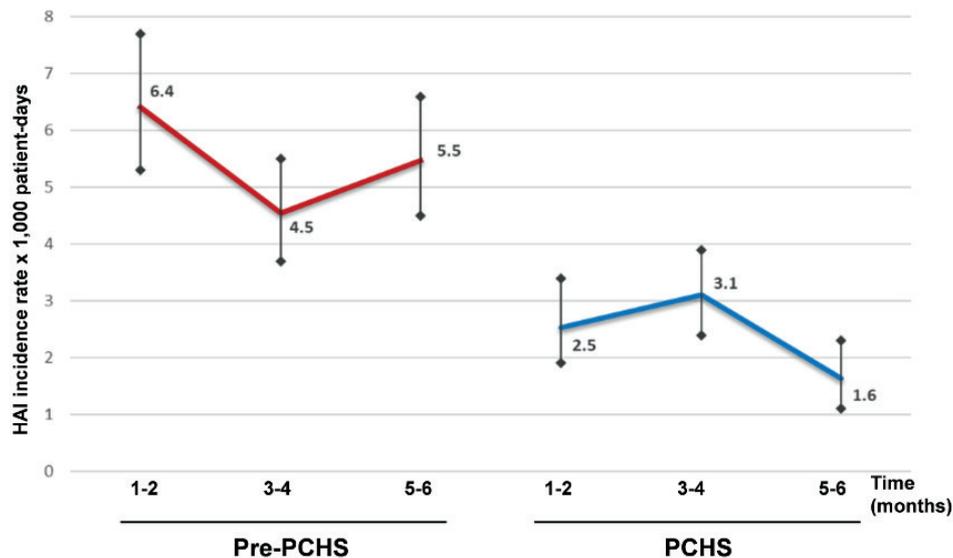


Fig 2. Tassi di incidenza delle ICA negli ospedali di intervento I1-I2. I risultati sono espressi come valori bimestrali del tasso di incidenza per 1,000 giorni-paziente, rispettivamente nei periodi pre-PCHS (rosso) e PCHS (blu). Sono riportati anche gli intervalli di IC 95%.

Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti esaminati sono risultate molto simili nei periodi pre-PCHS e PCHS dello studio, come mostrato in Tabella 2. L'analisi univariata ha confermato tra i fattori di rischio per lo sviluppo di ICA quelli già riportati in letteratura, indicando ad esempio una correlazione positiva con la presenza di cateteri urinari o venosi centrali e l'aumento dell'età, mentre sono emersi come effetti protettivi l'appartenenza al genere maschile e la condizione di autosufficienza (Tabella S1).



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

Tabella 2. Caratteristiche dei pazienti degli ospedali I1-I2 nei periodi pre-PCHS e PCHS (11,461 pazienti)

Caratteristiche dei pazienti	Pre-PCHS	PCHS
	Totale pazienti No. (%)	Totale pazienti No. (%)
Totale	5,930	5,531
Genere: maschio	2,977 (50.2%)	2,928 (52.9%)
Età <65	1,518 (25.6%)	1,265 (22.9%)
Età 65-74	1,261 (21.3%)	1,177 (21.3%)
Età 75-84	1,821 (30.7%)	1,753 (31.7%)
Età ≥85	1,330 (22.4%)	1,336 (24.2%)
Incontinenza	1,448 (24.4%)	1,369 (24.8%)
Disorientamento	804 (13.6%)	747 (13.5%)
Autosufficienza	3,671 (61.9%)	3,632 (65.7%)
Piaghe da decubito	393 (6.6%)	237 (4.3%)
Post-operatorio (30 giorni)	122 (2.1%)	80 (1.4%)
Ventilazione	215 (3.6%)	161 (2.9%)
Nutrizione parenterale	200 (3.4%)	141 (2.5%)
ATB 2 settimane prima	566 (9.5%)	294 (5.3%)
MDRO all'ammissione	131 (2.2%)	83 (1.5%)
Infezione all'ammissione	1,216 (20.5%)	1,089 (19.7%)
Catetere urinario (ogni tipo)	1,368 (23.1%)	1,166 (21.1%)
CVC	264 (4.5%)	260 (4.7%)

Autosufficienza, abilità di provvedere a se stessi in modo autonomo, misurata tramite scala SSM (Self Sufficiency Matrix); ATB, antibiotici; MDRO, organismi multi-resistenti; CVC, catetere vascolare centrale.

Tra tutte le ICA osservate, le infezioni del tratto urinario (UTI) rappresentavano la tipologia di infezione più diffusa (Tabella 3), seguite dalle infezioni del sangue (BSI), dalla sepsi clinica sistemica, dalle infezioni gastrointestinali (GI), dalle infezioni della pelle e dei tessuti molli e dalle infezioni respiratorie. A seguito dell'introduzione del PCHS, l'incidenza cumulativa delle ICA più



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

frequenti è diminuita: UTI, dal 3% (179/5,930) all'1.2% (70/5,531); infezioni del sangue (BSI), dallo 0.9% (54/5,930) allo 0.6% (31/5,531); sepsi cliniche, da 0.4% (22/5,930) a 0.1% (5/5,531); infezioni gastrointestinali da 0.3% (17/5,930) a 0.1% (6/5,531); infezioni della pelle e dei tessuti molli da 0.3% (16/5,930) a 0.1% (6/5,531). Invece, la frequenza relativa di ciascuna tipologia di ICA non è cambiata significativamente nella fase PCHS rispetto a quella pre-PCHS.

Tabella 3. ICA nelle fasi pre-PCHS e PCHS, suddivise per tipologia.

		Pre-PCHS (I ₁ + I ₂) No. (%)	PCHS (I ₁ + I ₂) No. (%)	extC 1° semestre No. (%)	extC 2° semestre No. (%)
No. di ICA		314* (100%)	141° (100%)	15[#] (100%)	16[§] (100%)
Tipologia	Infezioni del tratto urinario-UTI	179 (57.0%)	70 (49.6%)	8 (53.3%)	6 (37.5%)
	Infezioni del sangue - BSI [correlate a CVC]	54 [10] (17.2%)	31 [7] (22.0%)	-	3 (18.8%)
	Sepsi cliniche	22 (7.0%)	5 (3.5%)	1 (6.7%)	-
	Gastrointestinali-IG	17 (5.4%)	6 (4.3%)	2 (13.3%)	-
	Pelle e tessuti molli	15 (4.8%)	6 (4.3%)	3 (20.0%)	1 (6.2%)
	Polmonite	12 (3.8%)	8 (5.7%)	-	2 (12.5%)
	Tratto respiratorio inferiore	10 (3.2%)	6 (4.3%)	-	3 (18.8%)
	Tratto riproduttivo	1 (0.3%)	-	-	-
	Occhio, orecchio, naso e gola o bocca EENT	1 (0.3%)	2 (1.4%)	-	-
	Osso e articolazioni	-	1 (0.7%)	-	-
	Intra-addominali	-	1 (0.7%)	-	-
	Infezioni del sito chirurgico	-	-	-	1 (6.2%)
	Non specificata	3 (1.0%)	5 (3.5%)	1 (6.7%)	-

* 256 pazienti con 1 ICA, 26 con 2 ICA, e 2 con 3 ICA

° 115 pazienti con 1 ICA, e 13 con 2 ICA

[#] 9 pazienti con 1 ICA, e 3 con 2 ICA

[§] 16 pazienti con 1 ICA

Analogamente, il numero di microrganismi associati alle ICA (identificati nei pazienti ICA-positivi) è diminuito significativamente da 332 nella fase pre-PCHS a 137 nella fase PCHS (Tabella 4), mentre le percentuali relative di microrganismi isolati sono rimaste inalterate: *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* sono stati infatti gli isolati più frequenti in entrambe le fasi. Da notare che non è stata riportata alcuna infezione sostenuta da *Bacilli* derivati da PCHS in nessuno dei pazienti ricoverati nelle strutture arruolate, a supporto dell'assenza di rischio infettivo associato all'uso dei *Bacilli* del PCHS, come indicato da studi precedenti.

Tabella 4. Microorganismi isolati da ICA durante le fasi pre-PCHS e PCHS negli ospedali I1-I2.

	Pre-PCHS	PCHS	
Infezioni*	301	135	
Esame non disponibile o negativo	27	19	
Esame disponibile	274	116	
Microorganismi isolati	Campioni (n,%)	Campioni (n,%)	PCHS vs pre-PCHS
<i>S. aureus</i>	21 (6.3%)	16 (11.6%)	-23.8%
<i>Staphylococcus spp.</i>	30 (9.0%)	10 (7.2%)	-66.6%
<i>Enterococcus spp.</i>	57 (17.2%)	24 (17.5%)	-57.8%
<i>Streptococcus spp.</i>	7 (2.1%)	4 (2.9%)	-42.8%
<i>C. difficile</i>	9 (2.7%)	3 (2.2%)	-66.6%
<i>E. coli</i>	93 (28%)	27 (19.7%)	-70.9%
<i>Klebsiella spp.</i>	19 (5.7%)	12 (8.7%)	-36.8%
<i>P. mirabilis</i>	15 (4.5%)	6 (4.3%)	-60.0%
<i>P. aeruginosa</i>	15 (4.5%)	10 (7.2%)	-33.3%
<i>Enterobacter spp.</i>	8 (2.4%)	1 (0.7%)	-87.5%
<i>Citrobacter spp.</i>	3 (0.9%)	0	-100%
<i>A. baumannii</i>	8 (2.4%)	5 (3.6%)	-37.5%
<i>Morganella spp.</i>	3 (0.9%)	0	-100%
Altre <i>Enterobacteriaceae</i>	1 (0.3%)	0	-100%
<i>Candida spp.</i>	26 (7.8%)	11 (8.0%)	-57.7%
Virus	5 (1.5%)	3 (2.1%)	-40.0%
Altri	12 (3.6%)	5 (3.6%)	-58.3%
Totale	332 (100%)	137 (100%)	-

*Nella fase pre-PCHS le 301 ICA comprendevano 13 co-infezioni; nella fase PCHS, le 135 ICA comprendevano 6 co-infezioni.

Il ruolo del PCHS nella riduzione dell'insorgenza di ICA è stato analizzato mediante analisi multivariata, che ha incluso tutti i parametri emersi come significativi dall'analisi univariata. I risultati (riassunti in Tabella 5), pur confermando come fattori di rischio statisticamente significativi la presenza



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

di cateteri venosi urinari o centrali (rispettivamente OR=2.68; 95% IC, 2.10-3.41 e OR=1.99; 95% IC 1.40-2.82), hanno evidenziato il PCHS come fattore protettivo indipendente e statisticamente significativo (OR=0.44; 95% IC, 0.35-0.54) (P<0.0001).

Tabella 5. Fattori di rischio associati all'insorgenza di ICA nei pazienti degli ospedali I₁-I₂: analisi multivariata*.

Caratteristiche della popolazione	P	OR	95% IC
Genere maschile	0.01812	0.78	0.63-0.96
Età 65-74 vs Età <65	0.0047	1.71	1.18-2.48
Età 75-84 vs Età <65	0.0004	1.88	1.33-2.67
Età 85 o superiore vs Età <65	0.0026	1.78	1.22-2.58
Durata del ricovero	p<0.0001	1.08	1.07-1.09
Incontinenza	0.2253	0.85	0.66-1.10
Disorientamento	0.0226	1.37	1.05-1.76
Auto sufficienza	0.5600	0.92	0.69-1.43
Piaghe da decubito	0.9757	0.99	0.69-1.44
Ventilazione	0.7702	1.07	0.68-1.67
ATB 2 settimane prima	0.8479	0.97	0.68-1.37
MDRO all'ammissione	0.6230	0.86	0.47-1.57
Catetere urinario (ogni tipo)	p<0.0001	2.68	2.10-3.41
CVC	0.0001	1.99	1.40-2.82
PCHS	p<0.0001	0.44	0.35-0.54

* include tutti i fattori riconosciuti come significativamente associati all'insorgenza di ICA mediante analisi univariata (11.461 pazienti).

Impatto della sanificazione sul microbiota delle superfici ospedaliere

L'analisi della contaminazione delle superfici, comprendente l'individuazione e la quantificazione di *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter*, *Clostridium difficile* e *Candida spp.*, ha evidenziato una contaminazione persistente in tutti i reparti coinvolti nel periodo pre-PCHS, con una carica patogena complessiva corrispondente a 22,737 CFU/m² (valore medio, range 17,053-60,632 CFU/m²), principalmente attribuibile alla contaminazione stafilococcica (carica media 21,895 CFU/m², range 13,684-57,263 CFU/m²). Altri generi batterici sono risultati meno abbondanti: *Enterobacteriaceae* (valore medio 1,784 CFU/m²; range 444-3.015 CFU/m²), *Acinetobacter* (valore medio 2,538 CFU/m²; range 214-3,836 CFU/m²), *Pseudomonas spp* (valore medio 361 CFU/m²; range 43-2,125 CFU/m²), *C. difficile* (valore medio 286 CFU/m²; range 137-842 CFU/m²) e *Candida spp.*



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

(valore medio 1,480 CFU/m²; range 1,075-5,508 CFU/m²) (file informativi di supporto: BioStudies, n° S-BSST75).

L'introduzione del PCHS nei cinque ospedali dei gruppi I₁ e I₂ ha indotto una diminuzione statisticamente significativa della contaminazione patogena da 22,737 CFU/m² a 4,632 CFU/m² (valore medio; intervallo 842-12,632 CFU/m²)($P < 0.0001$), corrispondente ad una diminuzione media dell'83% della carica patogena delle superfici (intervallo 70-96.3%) (Fig 3A). Al contrario, non sono state osservate variazioni nell'ospedale di controllo esterno tra i due periodi di osservazione.

Parallelamente, la quota dei *Bacilli* del PCHS è aumentata significativamente sulle superfici degli ospedali di intervento dallo 0% (valore mediano, intervallo 0-30%) al 69.8% (valore mediano, intervallo 39.9-86.8%) del microbiota totale delle superfici ($P < 0,0001$) (Fig. 3B). Nessun aumento della quantità di *Bacillus* è stato invece osservato nell'ospedale di controllo extC.

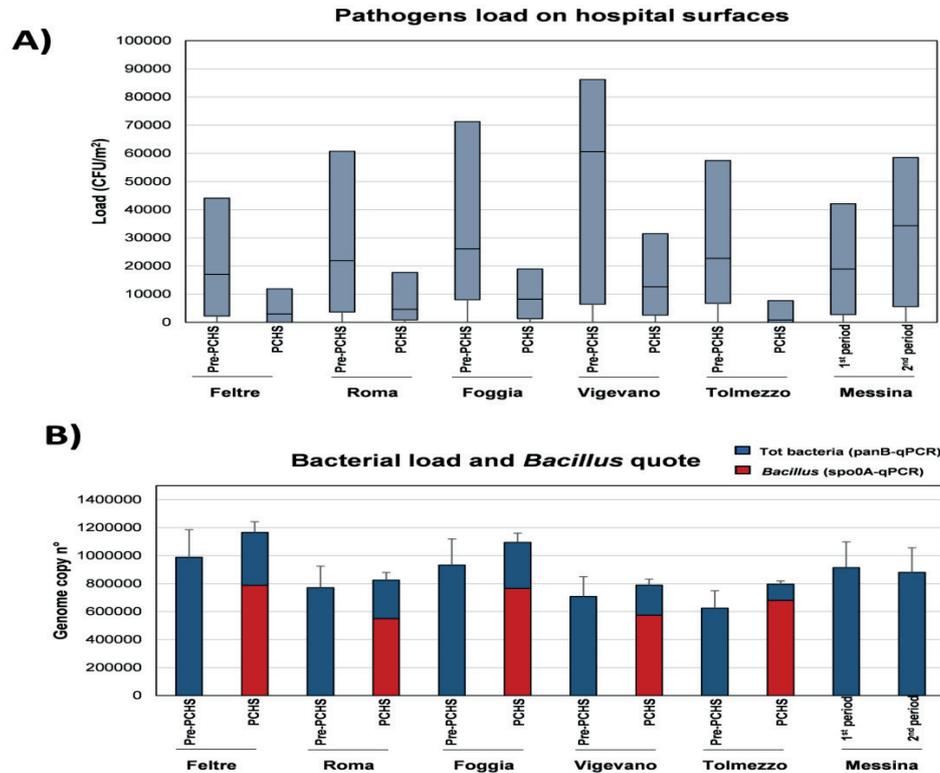


Fig. 3. Contaminazione delle superfici negli ospedali esaminati. (A) Carica patogena sulle superfici ospedaliere, espresso in CFU/m². Sei patogeni sono stati misurati mediante CFU diretta contando su piastre Rodac specifiche, come descritto nei Metodi (*Staphylococcal spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Candida spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.*). I risultati riportati graficamente rappresentano la somma dei valori medi ottenuti per ciascun agente patogeno misurato. I valori di mediana (parte inferiore del riquadro) e i valori Q3 (parte superiore del riquadro, che rappresenta i valori percentili del 75%) sono indicati per ogni ospedale e per le fasi pre-intervento (pre-PCHS) e post-intervento (PCHS). I valori riportati per l'ospedale di controllo esterno (Messina), corrispondono a quelli rilevati nei periodi di 1° e 2° semestre dell'indagine. (B) Carica batterica totale e quota dei *Bacilli* del PCHS, rispettivamente misurati mediante qPCR panbatterica (*panB*) e qPCR specifica per il genere *Bacillus* (*spo0A*). I risultati sono espressi come numero di copie del genoma per 100 ng di DNA analizzato. Vengono mostrati i valori mediani ± DS delle fasi pre-PCHS e PCHS. I valori riportati per l'ospedale di controllo esterno (Messina), corrispondono a quelli rilevati nei periodi di 1° e 2° semestre dell'indagine.

L'analisi mediante microarray del resistoma del microbiota ha evidenziato una significativa diminuzione globale dei geni di resistenza negli ospedali I₁-I₂ nella fase PCHS rispetto a quanto rilevato nel periodo pre-PCHS ($P < 0.0001$; $P = 0.008$) (Figura S1) (file informativi di supporto:



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

BioStudies, n° S-BSS75). La prevalenza dei geni R è risultata diversa nei singoli ospedali, probabilmente riflettendo la pressione selettiva esercitata in ciascuna struttura, ma la diminuzione dei geni R originariamente presenti durante la fase pre-PCHS è stata osservata in tutti gli ospedali. Non si è invece osservata alcuna diminuzione nell'ospedale di controllo esterno.

In parallelo, l'analisi mediante microarray del resistoma dei *Bacilli* del PCHS provenienti dalle superfici degli ospedali trattati, non ha mostrato alcuna acquisizione di geni R in tutti gli isolati testati durante l'intero periodo di studio (Fig. 4), confermando gli studi precedenti a supporto della stabilità genetica dei ceppi *Bacillus* contenuti nel PCHS.

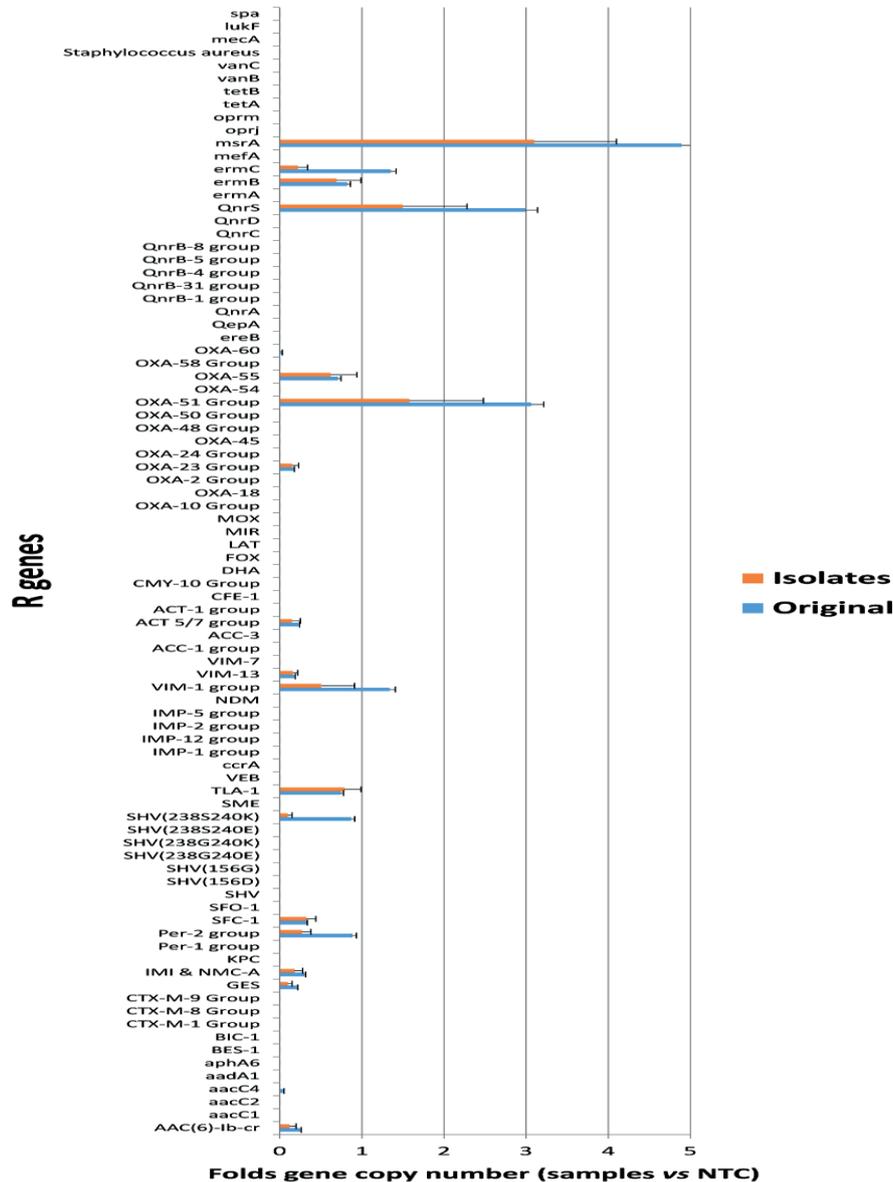


Fig. 4. Analisi del resistoma dei ceppi *Bacillus* del PCHS. Analisi dei geni di resistenza agli antibiotici rilevati nella miscela di tre specie batteriche contenute nel detergente PCHS (originale) e nei singoli isolati di *Bacillus* (isolati) raccolti da superfici dei gruppi di ospedali I₁ e I₂. Per i *Bacilli* del PCHS originali, i risultati sono espressi come valori medi ± DS di sei replicati. Per gli isolati, i risultati sono espressi come valore medio ± DS di 120 *Bacillus* isolati dalle superfici ospedaliere. Sia i valori relativi ai *Bacilli* Originali che ai *Bacilli* isolati sono stati confrontati con i valori di controllo negativi (NTC). Ciascun isolato di *Bacillus* è stato identificato mediante PCR e sequenziamento prima dell'analisi con microarray, come descritto in precedenza (29).



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

Discussione

Il ruolo della contaminazione stabile delle superfici nella trasmissione delle ICA è riconosciuto (6, 8-11), ma l'impatto della pulizia ambientale sull'incidenza delle ICA manca di dati solidi, poiché finora la maggior parte degli studi che correlano la contaminazione ambientale con l'incidenza delle ICA considerava un insieme di fattori, o si limitava a una tipologia specifica di reparto (ad esempio ICU)(32, 33).

Poiché abbiamo recentemente dimostrato che un sistema di sanificazione a base di probiotici (PCHS) è in grado di modulare il microbiota di superficie degli ospedali (27, 29), il presente studio pre-post intervento è stato finalizzato a indagare direttamente il potenziale impatto di questo sistema sull'incidenza delle ICA.

Secondo i nostri risultati, in assenza di altri interventi ICP, il PCHS è risultato associato a una significativa riduzione ($P < 0.0001$) dell'incidenza delle ICA nei reparti medici arruolati nello studio. La riduzione è stata osservata in tutte le ICA comunemente rilevate nei reparti di medicina interna, alcune delle quali sono associate alla trasmissione da contatto, e ciò si è associato ad una concomitante diminuzione dei microrganismi isolati associati, mentre le loro frequenze relative sono rimaste inalterate.

L'analisi multivariata, pur confermando il ruolo di fattori di rischio ben noti (34), quali la presenza di cateteri ($OR = 2.68$ e $OR = 1.99$ rispettivamente per cateteri urinari e CVC), ha fatto emergere il PCHS come fattore protettivo indipendente ($OR = 0.44$; 95% IC, 0.35-0.54) ($P < 0,0001$).

Inoltre, i dati sulla contaminazione hanno confermato in un ampio campione che il PCHS è in grado di ridurre e rimodulare la contaminazione ambientale, inducendo una significativa diminuzione (-83%) della carica patogena superficiale complessiva come pure dei geni di resistenza presenti nel microbiota delle superfici (fino a 2 Log)(27-29), suggerendo che i *Bacilli* probiotici possono competere e sostituire i patogeni preesistenti, limitando la colonizzazione e la diffusione di nuovi microrganismi potenzialmente patogeni e portatori di farmaco-resistenze (contaminazione da parte di assistenti



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

sanitari, nuovi pazienti, personale sanitario), mediante un meccanismo competitivo ben noto in natura (35-38).

Inoltre, il sistematico monitoraggio microbiologico e molecolare del presente studio supporta la sicurezza d'uso del PCHS osservata in studi precedenti (26, 27, 39), confermando la stabilità genetica dei *Bacilli* del PCHS e l'assenza di qualsiasi rischio infettivo correlato all'uso dei probiotici del PCHS in ambiente ospedaliero.

Limitazioni

Pur mostrando un forte effetto protettivo del PCHS, questo studio presenta alcune potenziali limitazioni. Un primo possibile limite è legato al disegno dello studio, che è un intervento pre-post eseguito negli stessi ospedali. Tuttavia, la dimensione del campione e l'entità della riduzione risultante sembrano indicare un chiaro ruolo del PCHS. Sulla base di questi risultati, ulteriori sviluppi potrebbero comprendere studi basati su campioni più ampi e su metodologie diverse, come prove stepped-wedge e/o prove cluster-randomized, inclusa una valutazione costi/efficacia. Inoltre, il numero di ospedali scelti come controllo esterno è ridotto, per cui le riduzioni non significative rilevate nello studio potrebbero essere dovute a questa limitazione. Poiché i contesti sanitari investigati si sono limitati alla medicina interna, alla geriatria e alla neurologia, sarebbe interessante ampliare in ulteriori studi l'impatto del PCHS in altri ambiti sanitari, al fine di comprendere meglio la generalizzabilità dei risultati ottenuti.

In secondo luogo, la dimensione del campione è stata calcolata per rilevare differenze nel campione globale e non nei singoli ospedali; tuttavia, i risultati hanno mostrato una diminuzione delle ICA in tutti gli ospedali, anche se non statisticamente significativa negli ospedali con una bassa incidenza di ICA di partenza.

In terzo luogo, un potenziale limite potrebbe essere rappresentato dalla consapevolezza del personale sanitario in merito allo studio stesso, ma il personale sanitario era solo a conoscenza di uno studio di incidenza sull'intero periodo (18 mesi). Inoltre, questo punto è stato affrontato limitando le informazioni esclusivamente ai manager ospedalieri, assumendo personale esterno per la raccolta dei dati e includendo un ospedale di controllo esterno per monitorare il potenziale impatto legato solo alla



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

presenza di uno studio in corso. Allo stesso tempo si deve considerare che il periodo di studio è stato molto lungo (complessivamente 18 mesi), limitando così la potenziale differenza d'attenzione da parte degli operatori sanitari coinvolti.

Un'ulteriore potenziale problema potrebbe essere legato alla stagionalità e alla distribuzione geografica degli ospedali arruolati. Il periodo di 6 mesi di follow-up potrebbe non essere sufficiente a minimizzare la variabilità stagionale, e similmente la mancanza di setting di tutte e 3 le regioni in tutti i gruppi potrebbe rappresentare un limite. Ulteriori studi dovrebbero perciò includere un periodo di follow-up più lungo e un arruolamento più robusto. Tuttavia, le dimensioni e le caratteristiche della riduzione delle ICA e il relativo effetto in termini di variazione del microbiota sembrano indicare che questi potenziali fattori di confondimento, se esistenti, potrebbero aver avuto un effetto limitato.

Infine, nonostante l'accordo di non introdurre misure per migliorare il controllo delle infezioni negli ospedali iscritti, un potenziale di confondimento è rappresentato dalla mancanza di misura dell'igiene delle mani durante l'intero periodo di studio.

CONCLUSIONI

Questo è il primo studio, a nostra conoscenza, che mostra un'associazione tra incidenza delle ICA e il microbiota ambientale in un campione così ampio. Nel complesso, i risultati raccolti potrebbero contribuire a sottolineare il ruolo della modulazione del microbiota ambientale nella sanificazione delle strutture sanitarie, introducendo la possibilità di un approccio ecologico nel campo della pulizia ambientale, che potrebbe essere inclusa tra gli strumenti efficaci disponibili per la prevenzione e il controllo delle infezioni (IPC). Ciò potrebbe sostenere politiche volte a ridurre lo sviluppo dei fenomeni di resistenza microbica ai disinfettanti e agli antibiotici, determinando un'efficace riduzione dei costi legati alla gestione delle ICA. D'altra parte, i nostri risultati potrebbero essere utili per introdurre metodologie di indagine sulla biocontaminazione ambientale e sulla circolazione del resistoma nelle strutture sanitarie, in quanto una sua analisi sistematica potrebbe aprire la possibilità di esplorare nuove strategie per controllarne la diffusione. Infine, questo studio apre nuove questioni da esplorare: l'applicabilità e l'impatto in diversi contesti, l'impatto su diverse tipologie di ICA, l'effetto a lungo termine dell'uso routinario del PCHS, le dinamiche tra la popolazione di patogeni umani e i



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

Bacilli probiotici e l'impatto sui costi relativi alla gestione delle ICA. Naturalmente, saranno necessarie analisi approfondite sul rapporto costi-efficacia, nonché studi futuri in grado di approfondire gli aspetti ancora mancanti in questa prima indagine sperimentale.

In conclusione, questi risultati potrebbero essere importanti per comprendere meglio il ruolo del microbiota ambientale nell'ambiente ospedaliero, incoraggiando lo sviluppo di linee guida riguardanti i sistemi di sanificazione ambientale, nell'ottica di un continuo miglioramento delle strategie IPC.

Informazioni di supporto

Tabella S1. Frequenza ICA in relazione alle caratteristiche dei pazienti degli ospedali I1-I2. Analisi univariata dei fattori di rischio per insorgenza di ICA nei pazienti delle fasi pre-PCHS e PCHS.

Caratteristiche dei pazienti	Pre-PCHS	PCHS	OR	95% IC
	Pazienti con ICA No. (%)	Pazienti con ICA No. (%)		
Totale	284 (4.8%)	128 (2.3%)		
Genere: maschio	119 (4.0%)	57 (1.9%)	0.69	0.57-0.85
Età <65	38 (2.5%)	12 (0.9%)	-	-
Età 65-74	67 (5.3%)	25 (2.1%)	2.14	1.51-3.04*
Età 75-84	107 (5.9%)	44 (2.5%)	2.41	1.74-3.33 [§]
Età ≥85	72 (5.4%)	47 (3.5%)	2.55	1.83-3.57 [°]
Incontinenza	99 (6.8%)	47 (3.4%)	1.72	1.40-2.11
Disorientamento	69 (8.6%)	31 (4.1%)	2.12	1.68-2.67
Autosufficienza	122 (3.3%)	57 (1.6%)	0.42	0.35-0.52
Piaghe da decubito	28 (7.1%)	13 (5.5%)	1.96	1.41-2.74
Post-operatorio (30 giorni)	3 (2.5%)	1 (1.3%)	0.54	0.20-1.45
Ventilazione	19 (8.8%)	9 (5.6%)	2.24	1.51-3.34
Nutrizione parenterale	10 (5.0%)	3 (2.1%)	1.07	0.61-1.87
ATB 2 settimane prima	41 (7.2%)	5 (1.7%)	1.58	1.15-2.16
MDRO all'ammissione	8 (6.1%)	6 (7.2%)	1.91	1.10-3.31
Infezione all'ammissione	48 (3.9%)	20 (1.8%)	0.78	0.60-1.01
Catetere urinario(ogni tipo)	144 (10.5%)	64 (5.5%)	3.82	3.14-4.66
CVC	37 (14.0%)	16 (6.2%)	3.32	2.45-4.49

*, Età 65-74 vs Età <65

§, Età 75-84 vs Età <65

°, Età 85 o superiore vs Età <65



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

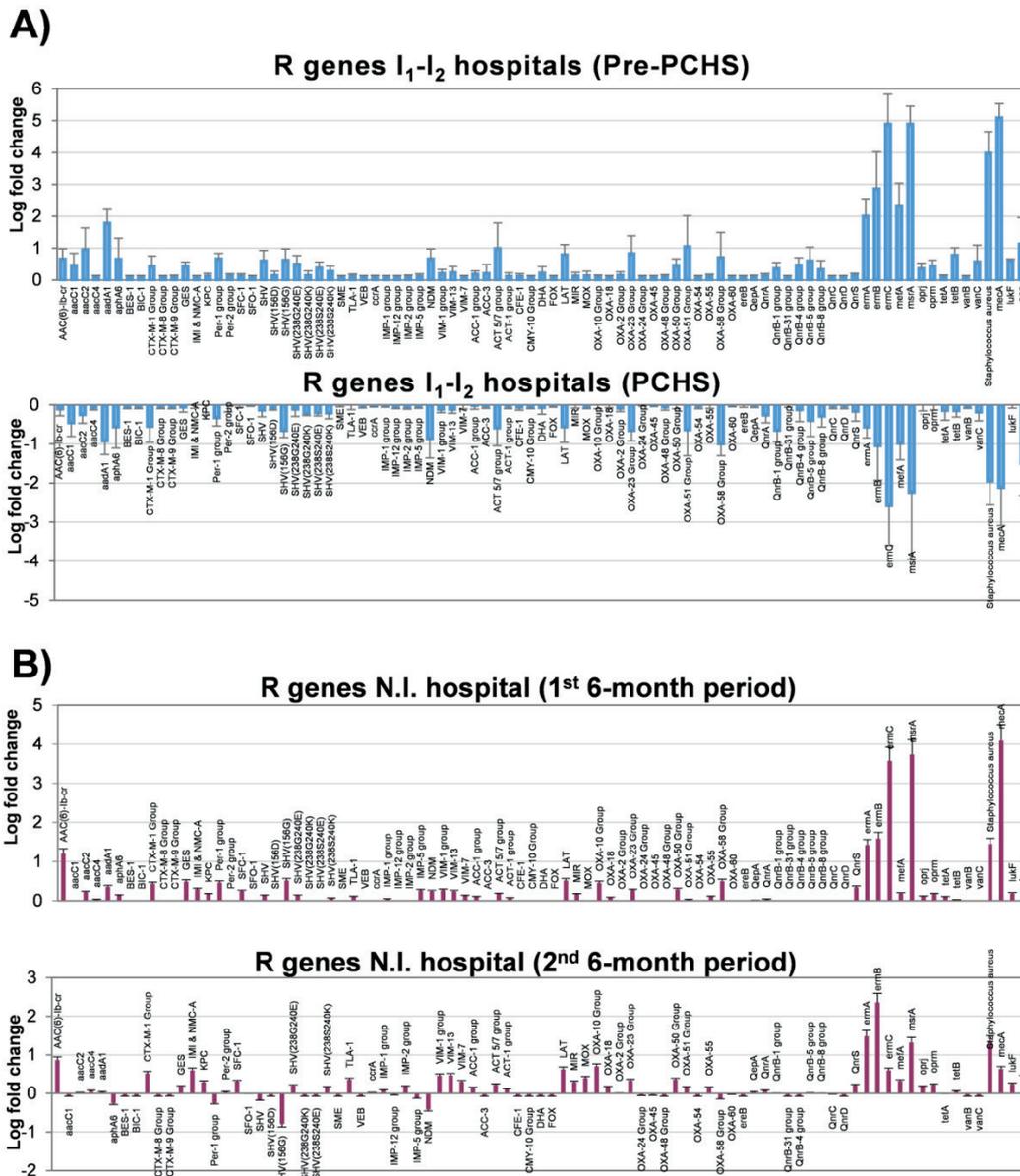


Figura S1. Resistoma del microbiota superficiale. (A) Analisi delle antibiotico-resistenza geniche nella popolazione contaminante dei 5 ospedali I1-I2, nelle fasi pre-PCHS e PCHS. I risultati sono espressi come media \pm SD della variazione, paragonato ai valori di controllo negativo (pre-PCHS) e ai valori pre-PCHS (PCHS). (B) Analisi delle antibiotico-resistenza geniche nella popolazione contaminante dell'ospedale di controllo esterno (extC), nel 1° e 2° periodo dello studio. I risultati sono espressi come media \pm SD della variazione, paragonato ai valori di controllo negativo (1° periodo) e ai valori del 1° periodo (2° periodo). (B)



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

RINGRAZIAMENTI

Il gruppo di studio SAN-ICA include: Maria D'Accolti, Micol Piffanelli, Irene Soffritti, Luca Lanzoni, Matteo Bisi, Antonella Volta, Maria Teresa Camerada, Piergiorgio Balboni, Carla Rognoni, Antonella Mastretti, Francesca Campanella, Paolo Grotto, Francesca Trozzi, Ermelinda Del Buono. Si ringraziano gli staff di tutti gli ospedali coinvolti per la loro assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA

1. Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;377(9761):228-41.
2. Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Diaz Ho"gberg L. Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control. . 2013.
3. Mancini A, Verdini D, La Vigna G, Recanatini C, Lombardi FE, Barocci S. Retrospective analysis of nosocomial infections in an Italian tertiary care hospital. *New Microbiol*. 2016;39(3).
4. Capozzi C, Capozzi A, Visconti G, Ignisti F, Panà A, Mastrobuono I. Le infezioni ospedaliere: elementi di epidemiologia e prevenzione. *Organizzazione Sanitaria*. 2004;3(4):3-26.
5. Messineo A, Marsella LT. Biological hazards and healthcare-associated infections in Italian healthcare facilities: some considerations on inspections and accountability. *Ann Ig*. 2015;27(6):799-807.
6. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect*. 2007;65 Suppl 2:50-4.
7. Mitchell BG, Dancer SJ, Anderson M, Dehn E. Risk of organism acquisition from prior room occupants: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect*. 2015;91(3):211-7.
8. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis*. 2004;39(8):1182-9.



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

9. Dancer SJ. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):665-90.
10. Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011;32(7):687-99.
11. Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect.* 2009;73(4):378-85.
12. Weber DJ, Anderson D, Rutala WA. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(4):338-44.
13. Weber DJ, Rutala WA. Role of environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(5):306-9.
14. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006;6:130.
15. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control.* 2010;38(5 Suppl 1):S25-33.
16. Goodman ER, Platt R, Bass R, Onderdonk AB, Yokoe DS, Huang SS. Impact of an environmental cleaning intervention on the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on surfaces in intensive care unit rooms. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(7):593-9.
17. Carling PC, Parry MF, Bruno-Murtha LA, Dick B. Improving environmental hygiene in 27 intensive care units to decrease multidrug-resistant bacterial transmission. *Crit Care Med.* 2010;38(4):1054-9.
18. Rutala WA, Weber DJ. Selection of the ideal disinfectant. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35(7):855-65.
19. Almatroudi A, Gosbell IB, Hu H, Jensen SO, Espedido BA, Tahir S, et al. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. *J Hosp Infect.* 2016;93(3):263-70.
20. Bock LJ, Wand ME, Sutton JM. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and adapted strains. *J Hosp Infect.* 2016;93(1):42-8.



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

21. 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.* 2017;61(1).
22. Cornejo-Juarez P, Vilar-Compte D, Perez-Jimenez C, Namendys-Silva SA, Sandoval-Hernandez S, Volkow-Fernandez P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J Infect Dis.* 2015;31:31-4.
23. Caini S, Hajdu A, Kurcz A, Borocz K. Hospital-acquired infections due to multidrug-resistant organisms in Hungary, 2005-2010. *Euro Surveill.* 2013;18(2).
24. Pettigrew MM, Johnson JK, Harris AD. The human microbiota: novel targets for hospital-acquired infections and antibiotic resistance. *Ann Epidemiol.* 2016;26(5):342-7.
25. Al-Ghalith GA, Knights D. Bygiene: The New Paradigm of Bidirectional Hygiene. *Yale J Biol Med.* 2015;88(4):359-65.
26. Caselli E, Antonioli P, Mazzacane S. Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation. *J Hosp Infect.* 2016;94(2):193-4.
27. Vandini A, Temmerman R, Frabetti A, Caselli E, Antonioli P, Balboni PG, et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS One.* 2014;9(9):e108598.
28. La Fauci V, Costa GB, Anastasi F, Facciola A, C. GO, Squeri R. An Innovative Approach to Hospital Sanitization Using Probiotics: In Vitro and Field Trials. *Microbial & Biochemical Technology.* 2015;7(3):5.
29. 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(2):e0148857.
30. Caselli E. Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings. *Microb Biotechnol.* 2017;10(5):1079-83.
31. ECDC. European surveillance of healthcare-associated infections in intensive care units 2015. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/healthcare-associated-infections-hai-icu-protocol.pdf>.
32. Donskey CJ. Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections? *Am J Infect Control.* 2013;41(5 Suppl):S12-9.



Research Article

Open Access

An Innovative Approach to Hospital Sanitization Using Probiotics: *In Vitro* and Field Trials

Vincenza La Fauci^{1*}, Gaetano Bruno Costa¹, Francesca Anastasi², Alessio Facciola², Orazio Claudio Grillo¹ and Raffaele Squeri¹

¹Department of Biomedical Sciences and Morphological and Functional Images, University of Messina, Messina, Italy

²Postgraduate Medical School in Hygiene and Preventive Medicine, University of Messina, Messina, Italy

Abstract

Background: The nosocomial infections continue to be a problem, even in hospitals where meticulous sanitization procedures are in place. The most commonly used methods employ chemical disinfectants which carry some disadvantages.

Objective: To investigate the effectiveness of an innovative sanitization procedure using probiotic bacteria based on the principle of biological competition: Probiotic Cleaning Hygiene System (PCHS).

Methods: The study included survival tests and *in vitro* and field trials. The *in vitro* trials tested three surfaces (washbasin, floor and desk) in the absence of recontamination. Field trials were carried out in order to evaluate the efficacy of probiotics in the presence of contaminants and to study whether probiotics are able to contain pathogens over time. Samples were taken from the floor in a corridor and an inpatient room and the dispensary washbasin twice daily (pre-sanitization and post-sanitization).

Results: The *in vitro* tests on three surfaces, not subject to recontamination, resulted in an average reduction ranging from 92.2% to 99.9% after 24 h. From field trials it emerged that the bacterial count was totally eliminated for *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* and almost 100% elimination of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* on all three surfaces after only six hours even when recontaminated. However, less satisfactory results were attained for *Staphylococcus aureus*.

Conclusion: PCHS acts constantly and is durable over time due to the stabilization of a biofilm which is able to reduce and contain the proliferation of pathogenic microorganisms. Probiotics are therefore effective innovative products to sanitize the hospital environment.

Keywords: Hospital sanitization; Probiotics; Nosocomial infections

Introduction

Hospital infections continue to be a huge healthcare problem worldwide to which no facility, public or private, is immune. The importance of inanimate surfaces as sources of nosocomial pathogens has long been recognized/acknowledged [1-3]. Environmental sanitization is an essential and effective part of programs to prevent and control hospital infections [4]. Sanitization procedures in hospitals, combined with antibiotic prophylaxis for patients, are designed to reduce and prevent the proliferation of microorganisms. Nevertheless, nosocomial infections continue to be a problem, even in hospitals where meticulous sanitization procedures are in place. The most common environmental sanitization methods involve the use of chemical disinfectants. However, these are not without disadvantages: 1) the limited effectiveness of biocides over time (normally 20-30 minutes after application, after which microorganisms multiply exponentially); 2) the ability of microorganisms to mutate thereby annihilating the biocidal effects; 3) increased pollution of the natural environment arising from the massive use of chemicals that may accumulate and persist over time. The seriousness of these problems prompted us to conduct trials using an innovative sanitization technique using probiotic bacteria adopting an approach based on the principle of biological competition in which the aim is no longer to destroy the microorganisms on surfaces, but to form a biofilm to counteract the proliferation of pathogens. Probiotic studies have attracted considerable interest in recent literature, particularly in view of increased bacterial resistance [3,5-7]. These products have long been used to reduce the occurrence and/or duration of diarrhoea attacks linked to antibiotics [8,9]; and *in vitro* trials are now underway to assess the possibility of using probiotics outside the human body on surfaces. Some studies have focused on the potential

ability of a biofilm to inhibit bacterial growth on silicone materials used in the urogenital tract [10,11,13,15] oral cavity [12,14] and/or other matrices [10,16]. Recent trials have shown that probiotic bacteria may also be used to sanitize hospital environments in order to combat the increase in nosocomial pathogens [17,18]. Probiotic bacteria (Probiotics in progress/PIPs) are spores of *Bacillus spp.* and considered to be innocuous microorganisms as, unlike disinfectants, they do not act as biocides. They are able to colonize surfaces to which they are applied, thereby effectively counteracting the proliferation and survival of other types of bacteria, including germs, by means of "competitive exclusion".

Materials and Methods

The aim of this study, carried out in the year 2013 at the University Hospital "G. Martino" in Messina (Italy), was to measure the reduction and elimination of pathogenic microorganisms using probiotics and thereby assess the effectiveness of this sanitization method. The Probiotic Cleaning Hygiene System (PCHS) was adopted for this study

***Corresponding author:** Vincenza La Fauci, Department of Biomedical Sciences and Morphological and Functional Images, A.O.U. Policlinico "G. Martino", Torre Biologica 1 Piano, Via Consolare Valeria, 98125 MESSINA, Italy, Tel: +390902213620; Fax: +390902213351; E-mail: vlafauci@unime.it

Received April 14, 2015; **Accepted** May 20, 2015; **Published** May 30, 2015

Citation: La Fauci V, Costa GB, Anastasi F, Facciola A, Grillo OC, et al. (2015) An Innovative Approach to Hospital Sanitization Using Probiotics: *In Vitro* and Field Trials. J Microb Biochem Technol 7: 160-164. doi:10.4172/1948-5948.1000198

Copyright: © 2015 La Fauci V, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited



centro studi controllo inquinamento fisico, chimico e microbiologico
di sale operatorie, camere bianche e ambienti confinati ad elevata sterilità
research centre on physical, chemical and microbiological pollution control

