

Βιολογικός Έλεγχος σε Συμπαγείς Επιφάνειες σε Νοσοκομεία Χρησιμοποιώντας Μίκρο-Βιολογικά Προϊόντα Καθαρισμού

1. CIAS Εργαστήριο, Κέντρο Μελέτης οργανικής, χημικής και μικροβιολογικής Μόλυνσης Περιβαλλόντων Υψηλής Αποστείρωσης, Τμήμα Αρχιτεκτονικής, Πανεπιστήμιο της Φεράρα, Ιταλία, 2. Εργαστήριο Μικροβιολογικής Οικολογίας και Τεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Γκεντ, Γκεντ, Βέλγιο, 3. Τμήμα Κρίσαλ Ρ & Δ, Λόμελ, Βέλγιο, 4. Τμήμα Ιατρικών Επιστημών, Τομέας Μικροβιολογίας Πρόληψης Ελέγχου Μολύνσεων και Διαχείριση Κινδύνου, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Φεράρας, Φεράρα, Ιταλία, 6. Τμήμα Βιο-ιατρικών και Νευροβιομηχανικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο της Μπολόνια, Μπολόνια, Ιταλία, 7. Τμήμα Ζωτικών Επιστημών και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο της Φεράρα, Φεράρα, Ιταλία.

Περίληψη

Ιστορικό: Οι **Μολύνσεις Φροντίδας Υγείας (ΜΦΥ)** είναι κάποιες από τις πιο συχνές επιπλοκές που προκύπτουν σε εγκαταστάσεις φροντίδας υγείας. Οι μολυσμένες επιφάνειες του περιβάλλοντος συνιστούν μια σημαντική εν δυνάμει πηγή μετάδοσης πολλών παθογόνων σχετικών με την φροντίδα υγείας, έτσι ώστε να υποδεικνύουν την ανάγκη για νέες κραταιές στρατηγικές.

Σκοπός: Η παρούσα μελέτη έχει στόχο να αξιολογήσει το αποτέλεσμα ενός νέου μηχανισμού καθαριότητας που βασίζεται στον **βίο-έλεγχο** την παρουσία και την επιβίωση αρκετών μικροοργανισμών που ευθύνονται για **ΜΦΥ** (π.χ. Coliforms, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile), σε συμπαγείς επιφάνειες σε ένα περιβάλλον νοσοκομείου.

Μέθοδοι: Το αποτέλεσμα του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού, το οποίο περιέχει σπορία Bacillus rumplus και Bacillus megaterium, σε σύγκριση με τα πρωτόκολλα συμβατικού καθαρισμού, αξιολογήθηκε για 24 εβδομάδες σε τρία ανεξάρτητα νοσοκομεία (ένα στο Βέλγιο και δύο στην Ιταλία) και συλλέχθηκαν περίπου 20.000 **μίκρο-βιολογικά** δείγματα επιφανειών.

Συμπεράσματα: Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει τον **μίκρο-βιολογικό** καθαρισμό ως αποτελεσματική στρατηγική στην συνεχή μείωση του αριθμού μικροοργανισμών σχετικών με **ΜΦΥ** στις επιφάνειες. Οι πρώτες ενδείξεις στο πραγματικό επίπεδο των **ΜΦΥ** στις δοκιμές στα νοσοκομεία που παρατηρήθηκαν σε συνεχή βάση, είναι πολύ ελπιδοφόρα, και μπορούν να οδηγήσουν σε μία νέα αποδοτική στρατηγική σε σχέση με το κόστος, για να αλληλεπιδράσει ή να (βίο)ελέγξει τα παθογόνα που σχετίζονται με την φροντίδα υγείας.

Εύφημος μνεία: Vandini A, Temmerman R, Frabetti A, Caselli E, Antonioli P, et al. (2014) Βίο-έλεγχος στα Νοσοκομεία χρησιμοποιώντας **Μίκρο-Βιολογικά** Προϊόντα. PLoS ONE 9(9): e108598.

doi:10.1371/journal.pone.0108598

Εκδότης: Gabriele Berg, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Graz (TU Graz), Αυστρία

Ελήφθη 25 Μαΐου 2014 – Έγινε αποδεκτό 23 Αυγούστου 2014 – Εκδόθηκε 6 Σεπτεμβρίου 2014

Πνευματικά Διακαιώματα: © 2014 Vandini et al. Το παρόν είναι ελεύθερο ως προς την πρόσβαση και διανέμεται υπό τους όρους του Creative Commons

Attribution License που επιτρέπει την άνευ περιορισμών χρήση, διανομή και αναπαραγωγή σε οποιοδήποτε μέσο, εφόσον αναφέρονται ο αρχικός συγγραφέας και οι πηγές.

Διαθεσιμότητα Δεδομένων: Οι συγγραφείς διαβεβαιώνουν πως όλα τα στοιχεία που αποτελούν την βάση των ευρημάτων της μελέτης είναι πλήρως διαθέσιμα χωρίς περιορισμό. Όλα τα σχετικά στοιχεία είναι μέσα στην μελέτη και τους φακέλους με τις πληροφορίες που υποστηρίζουν τα δεδομένα της.

Χρηματοδότηση: Αυτή η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από την COPMA srl, Chrisal NV και το Ινστιτούτο Flemish για την Προώθηση της Καινοτομίας από την Επιστήμη και την Τεχνολογία (IWT-Vlaanderen, Brussels, Belgium). Οι χρηματοδότες δεν είχαν λόγο στον σχεδιασμό της μελέτης, τη συλλογή και την ανάλυση στοιχείων, στην απόφαση για την έκδοση της μελέτης ή την προετοιμασία του κειμένου.

Συμφέροντα Ανταγωνισμού: Οι συγγραφείς δηλώνουν πως έλαβαν χρηματοδότηση από την εμπορική εταιρία Copma srl και πως ο Dr Robin Temmerman είναι μέλος με τον εμπορικό χρηματοδότη της παρούσας μελέτης (Chrisal, Lommel, Βέλγιο). Αυτό το γεγονός δεν αλλάζει την πίστη των συγγραφέων στις πολιτικές του PLOS ONE σχετικά με την διανομή στοιχείων και υλικών.

* Email: sante.mazzacane@unife.it

Εισαγωγή

Οι **Μολύνσεις που σχετίζονται με την Φροντίδα-Υγείας (ΜΦΥ)** είναι από τις πιο συχνές επιπλοκές που προκύπτουν σε εγκαταστάσεις της φροντίδας της υγείας και αποτελούν ανησυχητική υπόθεση όσον αφορά την ασφάλεια και την ποιότητα της παγκόσμιας φροντίδας υγείας [1], όπως επίσης σε πρόσφατη αναφορά από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, αναφέρεται η επικράτηση σε νοσοκομεία στο 8% σε χώρες υψηλού εισοδήματος [2].

Το Ευρωπαϊκό Κέντρο για τον Έλεγχο Νοσημάτων τονίζει την επικρατούσα μελέτη επιβεβαιώνοντας ότι οι μολύνσεις οι οποίες σχετίζονται με την φροντίδα υγείας αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα για την δημόσια υγεία στην Ευρώπη, με επικράτηση 5,7% (4,5 - 7,4%) το οποίο σημαίνει 81.089 (64.624 - 105.895) ασθενείς με μία **ΜΦΥ** για κάθε ημέρα σε Ευρωπαϊκά νοσοκομεία με ευρεία φροντίδα [3]. Συγκεκριμένα, αυτή η Ευρωπαϊκή μελέτη ανέφερε παρόμοια εκτίμηση νοσοκομειακών μολύνσεων για την Ιταλία και το Βέλγιο, όπου το ποσοστό των ασθενειών με **ΜΦΥ** υπολογίζεται 6,3% (5,4 - 7,4%) και 7,1% (6,1 - 8,3%) αντίστοιχα [1]. Βάσει της παραπάνω μελέτης ο ετήσιος αριθμός των ασθενειών με μία **ΜΦΥ** σε Ευρωπαϊκά νοσοκομεία άμεσης φροντίδας μέσα στο 2011- 2012 ήταν 3,2 εκατομμύρια, αν και με ένα ευρύ κενό αξιοπιστίας από 1,9 έως 5,2 εκατομμύρια ασθενείς. Παρόμοια περιστατικά μετρήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής [4]. Εκτός των ανθρώπων που υπέφεραν, είναι επίσης εντυπωσιακό το οικονομικό κόστος που σχετίζεται με την διαχείριση **ΜΦΥ**. Πράγματι, όπως αναφέρεται από τα **Κέντρα Ελέγχου Νοσημάτων και Πρόληψης (ΚΕΝΠ)**, εκτιμάται ότι οι γενικές άμεσες ετήσιες δαπάνες για μολύνσεις οι οποίες σχετίζονται με την φροντίδα υγείας στα νοσοκομεία κυμαίνεται από 35,7 σε 45 δισεκατομμύρια δολάρια στις Ηνωμένες Πολιτείες [5]. Επιπλέον, η διαχείριση, η πρόληψη και ο έλεγχος των **ΜΦΥ** στις μέρες μας είναι ακόμη μια πρόκληση για τις εγκαταστάσεις φροντίδας υγείας [6,7].

Οι μικροοργανισμοί που συχνά απομονώνονται από **ΜΦΥ** είναι, σε φθίνουσα σειρά, *Escherichia coli* (15,9%), *Staphylococcus aureus* (12,3%), *Enterococcus spp.* (9,6%), *Pseudomonas auruginosa* (8,9%), *Klebsiella spp.* (8,7%), *Coagulase-negative staphylococci* (7,5%), *Candida spp.* (6,1%), *Clostridium difficile* (5,4%), *Entero- bacter spp.* (4,2%), *Proteus spp.* (3,8%) και *Acinetobacter spp.* (3,6%) [3].

Ένα σημαντικό αμφιλεγόμενο και αμφισβητήσιμο ζήτημα είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός ρόλος του περιβάλλοντος στη διαδικασία μόλυνσης των ασθενών, ιδιαίτερα ο ρόλος των επιφανειών στην απομόνωση και την επίπλωση. Είναι ευρέως γνωστόν ότι οι επιφάνειες δρουν ως δεξαμενές για μικροοργανισμούς και θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην μετάδοση των νοσοκομειακών παθογενειών, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο της επαναμόλυνσης μέσω έμμεσης επαφής με τον ασθενή [8-10]. Με σκοπό να μειωθούν παρόμοιοι κίνδυνοι, εφαρμόζονται διαδικασίες εξυγίανσης σε κάθε επιφάνεια με την οποία άμεσα ή έμμεσα πιθανόν να έρθουν σε επαφή οι άνθρωποι. Παρά τις πειραματικές αποδείξεις που αναφέρουν ότι συστήνεται λογική χρήση απολυμαντικών, η συστηματική τους χρήση είναι ακόμη αμφιλεγόμενη [11-12]. Ωστόσο, συνιστάται από τις διεθνείς οδηγίες ως σημαντική διαδικασία έτσι ώστε να αποφευχθούν οι μολύνσεις [13-17], όπως επίσης υπάρχουν αξιολογικά στοιχεία σχετικά με τα οφέλη της καθαριότητας των νοσοκομείων μειώνοντας **ΜΦΥ** [18]. Πράγματι, η ανεπάρκεια να διασφαλιστούν ο ορθός καθαρισμός, η αποστείρωση ή η απολύμανση μπορεί να οδηγήσει στην μετάδοση των παθογόνων από ασθενή σε ασθενή [19].

Παρ' όλ' αυτά, η ευρεία χρήση χημικών απολυμαντικών παρουσιάζει κινδύνους στο περιβάλλον και στην ασφάλεια του προσωπικού. Είναι ξεκάθαρο ότι οι μικροοργανισμοί μπορούν να προσαρμοστούν σε ποικίλες φυσικές και χημικές συνθήκες και γι' αυτό το λόγο δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι έχει σημειωθεί ανθεκτικότητα στα αντισηπτικά και απολυμαντικά τα οποία χρησιμοποιούνται εκτενώς [20-21]. Για αυτό το λόγο, η σπουδαιότητα των διαδικασιών καθαριότητας που στοχεύουν στον έλεγχο του όγκου των παθογόνων βακτηριδίων υποδεικνύει ότι είναι απαραίτητη μία νέα και συνεχής στρατηγική.

Μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, όπως αναφέρεται από τους Falagous & Makris, 2009, είναι η χρήση μη παθογόνων μικροοργανισμών, δηλαδή προβιοτικά και ορίζονται ως ζωντανοί μικροοργανισμοί ικανοί να προσδώσουν οφέλη υγείας στον αποδέκτη, να αποικίσουν συμπαγείς επιφάνειες, έτσι ώστε να αλληλεπιδράσουν στον πολλαπλασιασμό και άλλων ειδών βακτηριδίων [22], σύμφωνα με την ανταγωνιστική αρχή του αποκλεισμού (νόμος του Gause) [23-25]. Αυτή η έννοια έχει καθοριστεί ως βίο-έλεγχος όταν η εφαρμογή είναι ανταγωνιστική έναντι συγκεκριμένου παθογόνου [26], και έχει ήδη εφαρμοστεί με επιτυχία στην καταπολέμηση των *Legionella* στα συστήματα νερού [27].

Αρκετοί ερευνητές επισημαίνουν στοιχεία όπου οι προβιοτικοί τύποι μικροοργανισμών και των βιο-επιφανειών τους, ανταγωνίζονται την ανάπτυξη των νοσοκομειακών παθογόνων σε μη-έμψυχες επιφάνειες [28-32]. Ωστόσο, δεν έχει ποτέ εξετασθεί η καθεαυτού εφαρμογή προβιοτικών τύπων μικροοργανισμών σε συμπαγείς επιφάνειες ως διαδικασία καθαρισμού. Για αυτό το λόγο, η αυτή η μελέτη αξιολογεί τα αποτελέσματα του **μικρό-**

βιολογικού καθαρισμού σε σκληρές επιφάνειες σε νοσοκομεία με την παρουσία και/ή επιβίωσης **ΜΦΥ**, σχετικών μικροοργανισμών σε τέτοιου είδους επιφάνειες. Για να διευκολυνθεί η στατιστική σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων, η μελέτη διεξήχθη σε τρία ανεξάρτητα νοσοκομεία (ένα στο Βέλγιο και δύο στην Ιταλία). Η σύγκριση έγινε με χημικό καθαρισμό και απολυμαντικού πρωτόκολλου. Αυτή η έρευνα στοχεύει στο να παρέχει επαρκείς πληροφορίες και δεδομένα ώστε να καταλήξουμε αν η τεχνική **βιό-ελέγχου** των νοσοκομειακών επιφανειών μπορεί να δράσει ως μια συνεχή εναλλακτική ως προς τα χημικά απολυμαντικά.

Μέθοδοι

Προκαταρτικά Τεστ

Πριν από τις δοκιμές σε πραγματικό χώρο στα νοσοκομεία, ένας αριθμός προκαταρτικών τεστ διεξήχθησαν στο Πανεπιστήμιο Ghent, Πανεπιστήμιο της Φεράρα και το AZ Lokeren νοσοκομείο, έτσι ώστε να καθοριστεί ο πιο κατάλληλος σχηματισμός του **μικρο-βιολογικού** καθαρισμού των προϊόντων προς χρήση. Κυρίως η ταυτότητα και η συγκέντρωση των μικροοργανισμών τα οποία χρησιμοποιούνται στα προϊόντα καθαρισμού, επιλέχθησαν με στόχο τον κατά μέσο όρο μικροβιολογικό όγκο σε σκληρές επιφάνειες, το pH, την θερμοκρασία και την υγρασία. Τα προϊόντα **μικρο-βιολογικού** καθαρισμού που χρησιμοποιούνται σε επιτόπου δοκιμές συνιστούσαν σπόρια *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* και *Bacillus megaterium*, με ορισμένη ποσότητα από 5610^7 CFU ανά मिलीλιτρο του συμπυκνωμένου προϊόντος. Όλα τα προϊόντα κατασκευάστηκαν από την εταιρεία Chrisal (Lommel, Βέλγιο) και τα προμήθευσαν στο νοσοκομείο AZ Lokeren της Chrisal και των δύο Ιταλικών νοσοκομείων από την Corpa srl. (Φεράρα, Ιταλία).

Με σκοπό να αποφευχθεί η μεροληψία στις πραγματικές δοκιμές εξαιτίας των απορρυπαντικών στα προϊόντα που χρησιμοποιούνται, έλαβαν χώρα αρκετές επιτόπου δοκιμές στο νοσοκομείο AZ Lokeren έτσι ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα ανάμεσα στην **μικρο-βιολογική** και την μη **μικρο-βιολογική** εκδοχή των προϊόντων (τα δεδομένα δεν παρέχονται).

Δήλωση Δεοντολογίας

Το πρωτόκολλο της μελέτης εξετάστηκε, αναθεωρήθηκε και εγκρίθηκε από τις τοπικές Επιτροπές Δεοντολογίας. Οι δοκιμές στα δύο Νοσοκομεία που βρίσκονται στην Φεράρα (Sant' Anna και San Giorgio) εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Δεοντολογίας, η οποία ονομάζεται Comitato Unico della Provincia di Ferrara, (Unique Committee of the Ferrara Province), το Azienda Ospedaliero-Universitaria of Ferrara, (Φεράρα, Ιταλία). Για τον χώρο του νοσοκομείου AZ Lokeren, η μελέτη αξιολογήθηκε και εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας AZ Lokeren Ethisch Comite (Λόκερεν, Βέλγιο). Οι δύο Επιτροπές Δεοντολογίας ανέφεραν ότι δεν ήταν απαραίτητη η επίσημη εξουσιοδότηση επειδή τα προβιοτικά προϊόντα δεν θα χορηγούνταν άμεσα σε ασθενείς, αλλά θα χρησιμοποιούνταν μόνο για καθαρισμό νοσοκομειακών επιφανειών. Για αυτό το λόγο, οι Επιτροπές αντιπαρήλθαν την ανάγκη για

γραφτή ενημερωτική αποδοχή από τους συμμετέχοντες εξαιτίας της τήρησης των κανόνων της μελέτης.

Δοκιμή σε πραγματικό χώρο νοσοκομείου

Διεξήχθησαν τρεις ανεξάρτητες ξεχωριστές δοκιμές, τοπικά και χρονικά, σε νοσοκομεία. Σε κάθε ξεχωριστή δοκιμή σε πραγματικό σκηνικό νοσοκομείου έγινε σύγκριση με συμβατικά πρωτόκολλα υγιεινής (χρησιμοποιώντας χημικά καθαριστικά προϊόντα και απολυμαντικά). Ο έλεγχος των καθαριστικών προϊόντων στο νοσοκομείο AZ Lokeren αποτελούνταν από χημικά απορρυπαντικά (Ecolab, Groot Bijgaarden, Βέλγιο) και στα δύο Ιταλικά νοσοκομεία χρησιμοποιήθηκαν απορρυπαντικά με βάση τη χλωρίνη (Actichlor για όλες τις επιφάνειες που μπορούν να πλυθούν ακίνδυνα, Diversey S.p.A., Ιταλία). Τα μικρό-βιολογικά προϊόντα και στα τρία νοσοκομεία αποτελούνταν από καθαριστικό πατώματος, καθαριστικό εσωτερικών χώρων και καθαριστικό μπάνιου (Chrisal, Lommel, Βέλγιο). Έγινε σύγκριση ανάμεσα στον έλεγχο και τον μικρό-βιολογικό καθαρισμό και χρονικά αλλά και σε μονάδες με πανομοιότυπες υποδομές μέσα στο νοσοκομείο (όπως για παράδειγμα, δύο ορόφων γηριατρικής στο νοσοκομείο AZ Lokeren). Εκτός από τα προϊόντα, όλες οι άλλες παράμετροι που σχετίζονταν με τις διαδικασίες καθαρισμού (π.χ. συχνά χρησιμοποιημένο εξοπλισμό) ήταν ίδιες ανάμεσα στον έλεγχο και τον **μικρό-βιολογικό** καθαρισμό. Ο καθαρισμός στο νοσοκομείο AZ Lokeren διεξήχθη σύμφωνα με το υπάρχον πρωτόκολλο υγιεινής, και στα δύο άλλα Ιταλικά νοσοκομεία διεξήχθη σύμφωνα με το **Προβιοτικό Σύστημα Υγιεινούς Καθαρισμού (ΠΣΥΚ)** από την εταιρεία Corma srl. Το προσωπικό καθαριότητας δεν γνώριζε ότι έκανε χρήση **μικρό-βιολογικών** προϊόντων καθαρισμού.

Πτέρυγες νοσοκομείων – Νοσοκομείο Αποκατάστασης San Giorgio

Το νοσοκομείο San Giorgio (συνολική επιφάνεια 12.300 m²) είναι κέντρο αποκατάστασης για σοβαρές επίκτητες διαταραχές εγκεφαλικής βλάβης. Οι πτέρυγες που περιλαμβάνονται σ' αυτήν την μελέτη διανέμονται σ' ένα σύνολο τριών ορόφων, με κάθε όροφο (4.100 m²) να αποτελείται από δύο πανομοιότυπες κερδοσκοπικές πτέρυγες, δηλαδή την Μονάδα Σοβαρής Εγκεφαλικής Βλάβης και την Μονάδα Ιατρικής Αποκατάστασης. Αυτές οι δύο πτέρυγες είναι χωρισμένες με έναν κεντρικό διάδρομο και η κάθε μία αποτελείται από 22 θαλάμους ανάρρωσης (28 m²) με δύο κρεβάτια και μία τουαλέτα (4,2 m²). Σ' αυτά τα δύο περιβάλλοντα, οι επιφάνειες που αντιμετωπίστηκαν αποτελούνταν από το δωμάτιο, τον διάδρομο, τα πατώματα και τις τουαλέτες. Επιπλέον διεξήχθησαν διαδικασίες καθαριότητας και έγιναν δειγματοληψίες στα έξι γυμναστήρια που χρησιμοποιούνταν για την αποκατάσταση των ασθενών.

Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Sant' Anna

Οι πτέρυγες που περιλαμβάνονται στην μελέτη μέσα στο Νοσοκομείο Sant' Anna, αναφέρονται, η μία ως εσωτερικών ασθενών γενικής ιατρικής πτέρυγας αποτελούμενη από δύο πανομοιότυπους χώρους (που ονομάζονται S- και T-χώροι, ο καθένας με επιφάνεια 550 m²), και μία πτέρυγα εξωτερικών ασθενών που περιέχει τα τμήματα Οφθαλμολογίας, Καρδιολογίας και Ορθοπαιδικής (286 m² το καθένα, με θαλάμους 22 m²). Οι θάλαμοι ανάρρωσης, (συνολικά 20, με επιφάνεια 38 m² ο καθένας) και τουαλέτες 10 m²), παρακολουθούνταν με δειγματοληψίες μικροβιολογικές.

Νοσοκομείο AZ Lokeren

Σ' αυτήν την μελέτη δύο δομικά πανομοιότυπες μονάδες (500 m² ανά μονάδα) γηριατρικής έλαβαν μέρος στο σκηνικό του Νοσοκομείου AZ Lokeren. Οι πτέρυγες φιλοξενούν ηλικιωμένους που υποφέρουν από ένα ευρύ φάσμα ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων της χειρουργικής, της φροντίδας ημέρας και κάποιες περιπτώσεις που είναι απαραίτητη η θεραπεία μολύνσεων.

Μικροβιολογικές Εξετάσεις

Το αποτέλεσμα των **μικρο-βιολογικών** και συμβατικών προϊόντων, σε επιφάνειες με συγγενείς μικροοργανισμούς με **ΜΦΥ**, αξιολογήθηκε με δειγματοληψία των επιφανειών και μικροβιολογικές εξετάσεις με βάση την καλλιέργεια. Έγινε έλεγχος των ακόλουθων συγγενών **ΜΦΥ** μικροοργανισμών: *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli* και στα τρία νοσοκομεία: *Clostridium* spp. στο νοσοκομείο AZ Lokeren· *Candida albicans* στα νοσοκομεία Sant' Anna και San Giorgio. Σε διάρκεια έξι εβδομάδων στο Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Sant' Anna, 24 εβδομάδες στο νοσοκομείο AZ Lokeren και 66 εβδομάδες στο Νοσοκομείο San Giorgio, συλλέχθηκαν συνολικά 20.000 μικροβιολογικά δείγματα (μεταξύ έξι και οκτώ ωρών μετά τον καθαρισμό) από ένα ευρύ φάσμα επιφανειών όπως πατώματα, πόρτες, ντους, περβάζια παραθύρων, τουαλέτες, νιπτήρες, από πέτρα, ξύλο, πλαστικό, γυαλί ή μέταλλο.

Όλα τα δείγματα των επιφανειών εκτελέστηκαν εις τριπλούν με πλάκες επαφής **ΑΑΚΟ (Αντίγραφο Ανίχνευσης και Καταμέτρησης Οργανισμών)**, που χρησιμοποιούνται για μικροβιολογικό έλεγχο με ισοδύναμο επιφάνειας 24 cm² της επιφάνειας. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μέτρα ανάπτυξης: McConkey Agar (BBL MacConkney Agar, BD) ως επιλεκτικό και διαφοροποιημένο μέσο για την ανίχνευση και καταμέτρηση *Enterobacteriaceae* (ιδιαίτερα η ομάδα των coliform bacteria)· Baird Parker Agar (Meck Millipore Baird-Parker Agar) ως μέτρια επιλεκτικά και διαφορικά μέσα και καταμέτρηση coagulase-positive staphylococci, και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση *Staphylococcus aureus*· *Clostridium difficile* agar (BBL *Clostridium difficile*· και Sabouraud Dextrose Contact Agar με πρόσθετο choramphenicol (Merck Millipore) ως επιλεκτικό μέσο για την ανίχνευση και καταμέτρηση *Candida albicans*. Η εκκόλαψη έγινε αερόβια

σε 37uC (48 ώρες - 72 ώρες) για MacConkey, Baird Parker, Centrimide Agar και Sabouraud Dextrose Contact Agar, και αναερόβια χρησιμοποιώντας αναερόβια βάζα (GasPak, BD) σε 37uC (72 ώρες) για Clostridium difficile agar. Οι **Σχηματισμοί Μονάδων Αποικιών (ΣΜΑ)** σε όλες τις agar πλάκες, μετρήθηκαν με το χέρι μετά την περίοδο εκκόλαψής τους. Σποραδικά κάποια απομονωμένα στοιχεία από τις παραπάνω agar πλάκες ταυτοποιήθηκαν έτσι ώστε να ελεγχθεί η επιλεκτικότητα των χρησιμοποιούμενων μέσων. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων στοιχείων αξιολογήθηκε από την API 20 E (bioMérieux, Inc, Durham, NC, USA), BBL Enterotube II (BD Diagnostic Systems) for Escherichia coli, API Staph (bioMérieux, Inc) for Staphylococcus aureus, and API 20 C Aux (bioMérieux, Inc) for Candida albicans.

Αντιβιογράμματα

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στο Kirby-Bauer τεστ αντιμικροβιακής ευαισθησίας διάχυσης δίσκου [33-35], ακολουθώντας τα κριτήρια που οριοθετούνται από το κλινικό και εργαστηριακό ινστιτούτο, Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) [36-37]. Εν συντομία, μία agar πλάκα 90mm Mueller-Hinton εμβολιάστηκε με αιώρηση του Bacillus subtilis (ATCC 6633), ή με απομονωμένα ποικίλα στοιχεία Bacillus, που αντιστοιχούν στο επίπεδο 0.5 McFarland. Μετά από 15 λεπτά, ένας χάρτινος δίσκος (Oxoid Ltd., Thermo Scientific, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) εμποτισμένος με γνωστή συμπύκνωση ενός αντιμικροβιακού συστατικού το οποίο προστέθηκε, και οι πλάκες επώαστηκαν στους 37uC για 24-28 ώρες. Οι ζώνες περιορισμού (μεταφρασμένες σε mm) καταμετρήθηκαν, και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίστηκε στα κριτήρια που αναφέρονται στο CLSI (Πίνακας S1) [38].

Μοριακές αναλύσεις

Η παρουσία ανθεκτικών αντιμικροβιακών γονιδίων στα απομονωμένα στοιχεία Bacillus που συλλέχθηκαν αξιολογήθηκε με την ποσοτική μέθοδο πραγματικού χρόνου PCR (qPCR). Το μικροβιολογικό γονίδιο DNA αποστάχθηκε από κάθε ένα απομονωμένο στοιχείο με τον QIAmp UCP Pathogen Mini Kit, εξοπλισμό (Qiagen, Hilden, Γερμανία), ρυθμίζοντας την οδηγία του κατασκευαστή για την βέλτιστη διάλυση των Gram-positive bacilli και των σπορίων. Δύο μικρογραμμάρια απόσταξης DNA αναλύθηκαν από την Microbial DNA qPCR ποικιλία για Αντιβιοτική Αντίσταση Γονιδίων (Qiagen, Hilden, Γερμανία), χρησιμοποιώντας ένα όργανο Εφαρμοσμένου Βιο-συστήματος 7300 και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάλυση έλαβε χώρα στις ποικιλίες που παρουσιάστηκαν αρχικά στα προϊόντα καθαρισμού και σε 20 διαφορετικά στοιχεία από τα διαφορετικά περιβάλλοντα των νοσοκομείων που εμπίπτουν στην μελέτη. Νερό **Μίκρο-Βιολογικό** χωρίς DNA (Qiagen) και **Μίκρο-Βιολογικός** Θετικός Έλεγχος DNA (Qiagen) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί και ως θετικοί έλεγχοι, αντίστοιχα. Το DNA από την ποικιλία E. coli JM101 χρησιμοποιήθηκε επίσης

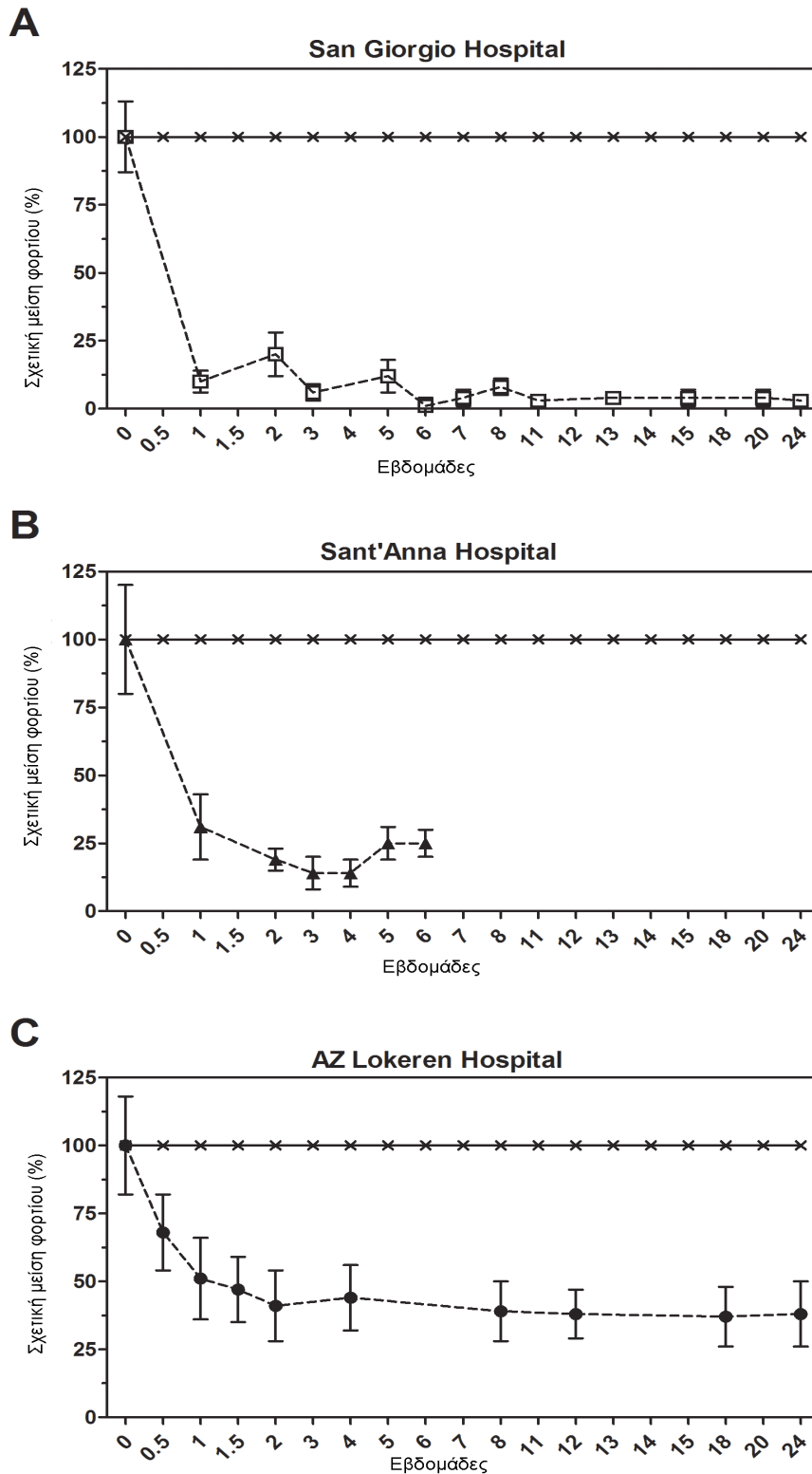
ως αρνητικός έλεγχος. Προπαρασκευαστικά τεστ έδειξαν ότι η ευαισθησία της μέτρησης ήταν περίπου 10 αντίτυπα για κάθε γονίδιο-στόχο.

Στατιστικές

Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε στα γενικευμένα γραμμικά μοντέλα για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Αυτή η μέθοδος συνδυάζει τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για κάθε οριακό μοντέλο με το γενικευμένο γραμμικό μοντέλο για ιζήματα που ακολουθούν την διανομή Poisson και τον λογάριθμο ως συνδυαστική λειτουργία. Διεξήχθησαν συγκρίσεις μεταξύ των βασικών και των μετέπειτα χρόνων χρησιμοποιώντας Wald Statistics με την διόρθωση Sidak για πολλαπλές συγκρίσεις. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας λογισμικό SPSS v 19.0 (IBM Corp., Armonk, Νέα Υόρκη, Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής).

Αποτελέσματα

Πριν από τις δοκιμές σε νοσοκομεία, διεξήχθη ένα ευρύ φάσμα δοκιμών in vitro-εργαστηριακά και σε μικρή κλίμακα, έτσι ώστε να καθοριστούν και τα καλύτερα δυνατόν πρωτόκολλα εξετάσεων και οι σχηματισμοί του προϊόντος για την καθεαυτού μελέτη, όπως επίσης και να παρέχεται σχετική πληροφόρηση στις επιτροπές δεοντολογίας. Το επίκεντρο της μελέτης εστιάστηκε σε μικροβιολογικές μετρήσεις και δεν έγιναν εκτιμήσεις στην καθεαυτή αφαίρεση της λέρας. Η χρήση των ποικίλων Bacillus στα προϊόντα καθαρισμού έδειξε μία πολύ μεγαλύτερη μικροβιολογική επιρροή σε συμπαγείς επιφάνειες σε σύγκριση με άλλα γένη (όπως Lactobacillus και Pseudomonas), κυρίως εξαιτίας της δυνατότητάς τους παραγωγής σπορίων (τα δεδομένα δεν παρέχονται). Βάσει των κατά μέσο όρο συνολικών τιμών μέτρησης διαφόρων ειδών συμπαγών επιφανειών σε νοσοκομεία, προσδιορίστηκε η βέλτιστη συμπύκνωση των Bacillus σπορίων που θα χρησιμοποιούνταν στους σχηματισμούς του προϊόντος. Αποφασίστηκε, πριν τις δοκιμές στα νοσοκομεία, ότι το ποσό των βακτηριδίων του προϊόντος που θα έμενε πάνω στις επιφάνειες με τον καθαρισμό θα ήταν του ίδιου μεγέθους με τον συνολικά κατά μέσο όρο μέτρησης που παρατηρήθηκε πριν την εφαρμογή του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού. Εν κατακλείδι, ένας αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων σε κλίμακα υπέδειξαν ότι οι ίδιοι σχηματισμοί του προϊόντος, με ή χωρίς την προσθήκη των σπορίων Bacillus, παρήγαγαν αξιοσημείωτα διαφορετικά αποτελέσματα σε παθογόνα φορτία στις επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν.



Διάγραμμα 1. Αποτελέσματα του **μικρο-βιολογικού** καθαρισμού σε μετρήσεις επιφανειών για coliforms. Οι μετρήσεις επιφανειών για coliforms στα περιβάλλοντα των νοσοκομείων San Giorgio (A), Sant' Anna (B) και AZ Lokeren (C). Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως σχετικό ποσοστό της εκατό της μείωσης σε σύγκριση με τον έλεγχο, οι οποίες καθαρίστηκαν με συμβατικά (απολυμαντικά) προϊόντα καθαρισμού. Ο έλεγχος παρουσιάζεται με την τιμή της **μικρο-βιολογικής** επιφάνειας της ρύπανσης (**MPE** μέτρηση), στην αρχή δοκιμών (εβδομάδα -0- μηδέν), της οποίας η μέτρηση **MPE**

ορίστηκε στο 100%, έτσι ώστε να ληφθούν αξιόπιστες συγκρίσεις ανάμεσα στα τρία δομικά διαφορετικά περιβάλλοντα νοσοκομείου. Η ανάλυση έδειξε ότι τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας S2).

doi: 10.1371/journal.pone .0108598.g001

Η μελέτη διεξήχθη σε τρία διαφορετικά νοσοκομεία και συλλέχθηκαν περίπου 20.000 **μικρο-βιολογικά** δείγματα επιφανειών. Οι **μικρο-βιολογικές** αναλύσεις εστίασαν στον *Staphylococcus auerus*, *coliform bacteria*, *Clostridium difficile* και *Candida albicans* ως αντιπροσωπευτικά ή ενδεικτικά για κατάλληλη υγιεινή και **ΜΦΥ** συσχετιζόμενους μικροοργανισμούς. Με σκοπό την κατάλληλη σύγκριση μεταξύ τριών περιβαλλόντων νοσοκομείου, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως σχετικές τιμές με τον έλεγχο, οι οποίες αναφέρονται στην τιμή της μόλυνσης (μέτρηση **ΣΜΑ**) στην αρχή των δοκιμών (εβδομάδα μηδέν -0-), όπως φαίνεται στους πίνακες S2, S3, S4, S5.

Ιδιαίτερος, το αποτέλεσμα του **μικρο-βιολογικού** καθαρισμού σε διαφορετικά σχετικά παθογόνα από **ΜΦΥ** έδειξε παρόμοιες τάσεις μεταξύ των τριών νοσοκομείων υπό παρακολούθηση. Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Sant' Anna, ο **μικρο-βιολογικός** δειγματοπισμός διήρκεσε έξι εβδομάδες, ενώ τα άλλα δύο νοσοκομεία παρακολουθούνταν έως την 24^η και 66^η εβδομάδα στο Νοσοκομείο San Giorgio, τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ περιορίζονται στις 24 εβδομάδες. Επίσης, κατά την διάρκεια των δοκιμών η συνολική **μικρο-βιολογική** μέτρηση αξιολογήθηκε επίσης, αλλά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές καθ' όλη την χρονική περίοδο που διήρκεσαν οι δοκιμές στα νοσοκομεία (τα δεδομένα δεν παρέχονται).

Coliforms και E. coli

Το Διάγραμμα 1 δείχνει τον μέσο όρο σχετικών τιμών για το φορτίο *coliform bacteria* ως γενικό δείκτη για την υγιεινή. Οι τιμές αναφοράς μετρήθηκαν στην εβδομάδα μηδέν -0- για *coliforms*, με *E. coli* να αντιπροσωπεύει περίπου το εν δεύτερον της μέτρησης, και αναφέρονται στον Πίνακα S2. Ωστόσο, οι ατομικές μετρήσεις επιφανειών μπορούν να διακυμαίνονται έντονα, ειδικότερα σε συγκεκριμένους χώρους, όπως τα λουτρά ή τα γηριατρικά τμήματα. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι με την έναρξη του **μικρο-βιολογικού** καθαρισμού είχαμε ως αποτέλεσμα την ταχεία μείωση των *coliform* και *E. coli* μετρήσεων, επιτυγχάνοντας έτσι το μεγαλύτερο δυνατό αποτέλεσμα περίπου μετά από δύο εβδομάδες καθημερινού καθαρισμού. Η κατά μέσο όρο μείωση με το πέρασμα του χρόνου ήταν $74\pm 21\%$ για τα *coliforms* και $89\pm 18\%$ για *E. coli*. Η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν στατιστικά σημαντική για όλα τα περιβάλλοντα των νοσοκομείων υπό παρακολούθηση (Πίνακας S2).

S. aureus

Τα κατά μέσο όρο επίπεδα του *S. aureus* στις επιφάνειες που εξετάστηκαν και η αντίστοιχη μείωση τοις εκατό με το πέρασμα του χρόνου αναφέρονται στον Πίνακα S3 και το Διάγραμμα 2 αντίστοιχα. Για να είναι πιο σαφής η ένδειξη δεν έγινε καμία διάκριση μεταξύ των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά ή των ευαίσθητων στα αντιβιοτικά *S. aureus*. Μετά από 10 ημέρες **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού μέσα στο περιβάλλον του νοσοκομείου San Giorgio, οι μετρήσεις *S. aureus* στις επιφάνειες μειώθηκαν, κατά μέσο όρο, $58\pm 12\%$ και $78\pm 15\%$ μετά από έξι εβδομάδες, με μείωση η οποία ήταν ιδιαίτερα σημαντική σε όλα τα περιβάλλοντα νοσοκομείου (Πίνακας S3). Και στον συμβατικό αλλά και στον **μίκρο-βιολογικό** καθαρισμό, οι μετρήσεις *S. aureus* στις επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν, έδειξαν μια μεγάλη σταθερότητα χωρίς μεγάλες εξαιρέσεις και αποκλίσεις (τα στοιχεία δεν παρέχονται), δηλώνοντας έτσι ότι ο συγκεκριμένος οργανισμός δεν είναι πολύ ευαίσθητος σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μέσα σε ένα νοσοκομείο και πιθανόν να επιβιώσουν στις πιο συνήθεις συνθήκες.

C. difficile

Ένας λιγότερος σε πληθώρα αλλά πολύ συχνός οργανισμός που συνδέεται με **ΜΦΥ** είναι ο *Clostridium difficile*, με μετρήσεις κατά μέσο όρο περίπου 500 CFU/m^2 (Πίνακας S4), το οποίο είναι κοντά στο όριο ανίχνευσης από τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτοί οι μικροοργανισμοί παρατηρήθηκαν σε τακτική βάση στο περιβάλλον του νοσοκομείου AZ Lokeren. Ο *C. difficile* έδειξε πολύ μεγαλύτερες συγκεκριμένες μετρήσεις σε διαφορετικές επιφάνειες, γεγονός το οποίο, σε συνδυασμό με τις γενικότερες κατώτατες μέσες μετρήσεις, είχαν ως αποτέλεσμα μεγαλύτερες συνήθεις αποκλίσεις, καθιστώντας έτσι το αποτέλεσμα του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού ελάχιστα σημαντικό σε σύγκριση με τον έλεγχο. Η γενική κατά μέσο όρο μείωση σε *C. difficile* φορτίο επετεύχθη πολύ γρήγορα μετά από τρεις ημέρες **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού, με μείωση που αντιστοιχεί σε $55\pm 47\%$ (Πίνακας 3). Οι συνεχιζόμενες μετρήσεις τις επόμενες 24 εβδομάδες έδειξαν ότι τα επίπεδα *C. difficile* σε καθορισμένες επιφάνειες με **μίκρο-βιολογικό** προϊόν μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ανάλυσης. Η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν σημαντική για τις εβδομάδες 4^η ($p=0,048$) και 12^η ($p=0,007$) και ιδιαίτερα για τις εβδομάδες 18^η ($p=0,0005$) και 24^η ($p=0,004$), δείχνοντας έτσι το μακροπρόθεσμο αποτέλεσμα στη μείωση του φορτίου *C. difficile*.

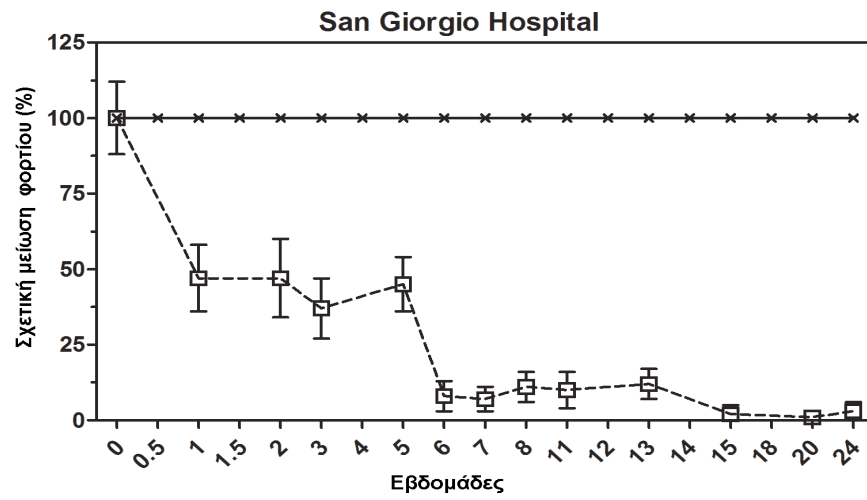
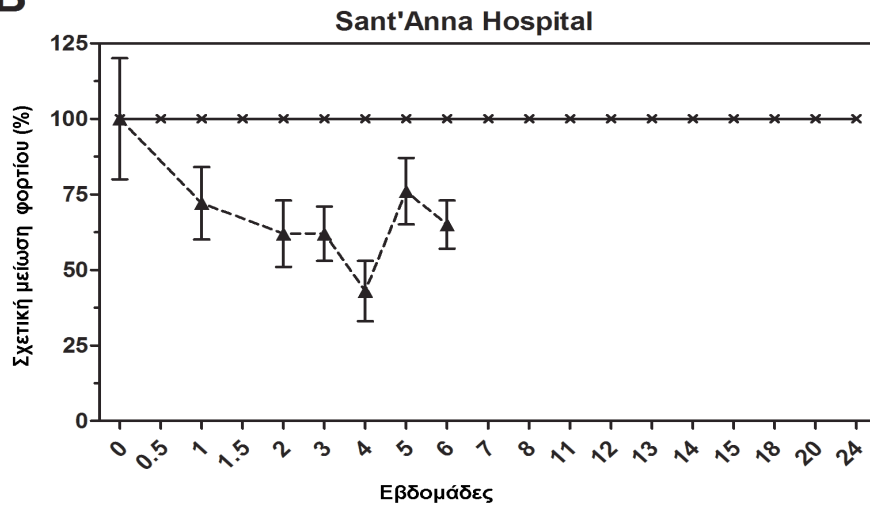
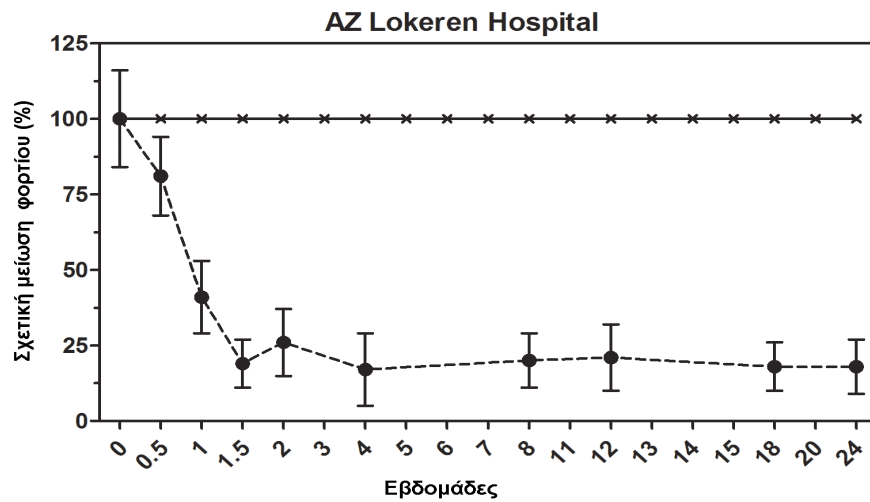
C. albicans

Το φορτίο *Candida albicans* μετρήθηκε σε τακτική βάση στα δύο Ιταλικά περιβάλλοντα νοσοκομείου. Το Διάγραμμα 4 δείχνει τις μέσες σχετικές τιμές της μείωσης του φορτίου. Οι μέσες τιμές ελέγχου των *C. albicans*

αναφέρονται στον Πίνακα S5. Ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός είχε ως αποτέλεσμα μία ταχεία μείωση του φορτίου, η οποία αντιστοιχεί στην τιμή του $82\pm 19\%$, μετά από μία εβδομάδα, και ιδιαίτερα το φορτίο των *C. albicans* διατηρήθηκε σταθερά σε χαμηλά επίπεδα τις επόμενες εβδομάδες. Από την δεύτερη κιόλας εβδομάδα, οι μετρήσεις των *C. albicans* που έδρευαν σε επιφάνειες όπου είχε γίνει μίκρο-βιολογικός καθαρισμός, ήταν ελάχιστα πάνω από το όριο ανίχνευσης των πρωτόκολλων των εξετάσεων. Πράγματι, η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν σημαντικά υψηλότερη και στα δύο περιβάλλοντα νοσοκομείου (Πίνακας S5).

Χρονική δοκιμή με συμβατικό και **μίκρο-βιολογικό** καθαρισμό

Ένα ξεχωριστό πείραμα διεξήχθη μέσα στο τμήμα της γηριατρικής στο Lokeren στο περιβάλλον AZ, όπου οι συμβατικές και **μίκρο-βιολογικές** διαδικασίες καθαρισμού εφαρμόστηκαν εκ περιτροπής και το φορτίο των βακτηριδίων ελέγχθηκε για 10 εβδομάδες. Ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός (από την εβδομάδα μηδέν -0- έως την 2^η εβδομάδα), ο οποίος τότε εφαρμόστηκε για μία δεύτερη περίοδο με διάρκεια τις τελευταίες 8 εβδομάδες (από την 2^η εβδομάδα έως την 10^η). Σταθερά όπως και στις προηγούμενες παρατηρήσεις, ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός μείωσε και τα φορτία coliforms και τα *S. aureus*, των οποίων οι μετρήσεις έπεσαν από 9250 ± 1750 MPE/m² σε 3200 ± 1200 MPE/m² και από 4200 ± 1200 MPE/m² σε 950 ± 450 MPE/m², αντίστοιχα. Αντίθετα, όταν ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός αντικαταστάθηκε από την συμβατική διαδικασία, και τα δύο φορτία αυξήθηκαν σε μετρήσεις αποικιών συγκρίσιμες με αυτές που παρατηρήθηκαν πριν την εφαρμογή του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού (ανάμεσα στην 22^η και την εβδομάδα μηδέν -0-) (Πίνακας 5).

A**B****C**

Διάγραμμα 2. Το αποτέλεσμα του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού στις μετρήσεις επιφάνειας για *S. aureus*.

Οι μετρήσεις επιφάνειας για *S. aureus* στο San Giorgio (A), Sant' Anna (B) και AZ Lokeren (C), περιβάλλοντα νοσοκομείων. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως σχετικό ποσοστό τοις εκατό της μείωσης σε σύγκριση με τον έλεγχο, οι οποίες καθαρίστηκαν με συμβατικά (απολυμαντικά) προϊόντα καθαρισμού. Η ανάλυση έδειξε ότι τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας S3).

doi: 10.1371/journal.pone .0108598.g002

Η εφαρμογή του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού οδήγησε σε αξιοσημείωτη μείωση στο παθογενές φορτίο των coliforms ($p=0,0001$, από την μισή εβδομάδα (0,5) έως την 3^η εβδομάδα) και το *S. aureus* ($p=0,003$ από την 1^η εβδομάδα έως την 3^η εβδομάδα) σε σύγκριση με τις μετρήσεις την εβδομάδα μηδέν (0), όπου, αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μετά την αντικατάσταση του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού με την συμβατική διαδικασία.

Γενικά, τα στοιχεία για τον **μίκρο-βιολογικό** καθαρισμό υπέδειξαν ότι με το πέρασμα του χρόνου διατηρήθηκε έντονη μείωση του παθογόνου φορτίου, και το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε ήταν άμεσα συνδεδεμένο με την εφαρμογή του, όπως υποδηλώνεται από την σύγκριση με τον συμβατικό καθαρισμό.

Ευαισθησία/ανθεκτικότητα των στοιχείων *Bacillus* στα αντιβιοτικά

Για να ελεγχθεί η εμφάνιση της ανθεκτικότητας των μικροβίων σε ποικιλίες *Bacillus*, διεξάγαμε και συμβατικά αντιβιογράμματα όπως επίσης και μοριακές αναλύσεις σε στοιχεία *Bacillus* τα οποία συλλέχθηκαν στις επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα από τα αντιβιογράμματα έδειξαν ότι τα *Bacilli* που εξετάστηκαν, προερχόμενα και από τα PCHS προϊόντα και τα στοιχεία τους, έδειξαν την γνωστή ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη. Το προφίλ της ευαισθησίας για τα άλλα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν (cefoperazone, cefalotin και gentamicin) ήταν συγκρίσιμα με τα στοιχεία αναφοράς ATCC, με την μόνη εξαίρεση της clindamycin, για την οποία παρατηρήθηκαν οι άμεσες τιμές (Πίνακας 1).

Για να αυξηθεί ο αριθμός της ανθεκτικότητας, αντιμικροβιακών παραγόντων που αναλύθηκαν, 20 *Bacillus* στοιχεία, τα οποία συλλέχθηκαν 6 με 12 μήνες μετά την έναρξη της δοκιμής στο νοσοκομείο, αναλύθηκαν επίσης από μία qPCR μέτρηση ικανή να ανιχνεύσει 87 διαφορετικά γονίδια συνδεδεμένα με την αντιβιοτική ανθεκτικότητα. Πριν από την εξέταση των στοιχείων *Bacillus*, η μέθοδος που δημιουργήθηκε σε γνωστά DNA δείγματα *Bacillus* spp., τα οποία υπέδειξαν αυτή την τεχνική ως ένα αξιόπιστο εργαλείο για μετέπειτα ανάλυση. Η ανάλυση των κατά βάση-προβιοτικών προϊόντων καθαρισμού αποκάλυψαν την ύπαρξη συνεχών ανθεκτικών γονιδίων στο είδος *Bacillus* που περιέχεται στον αρχικό σχηματισμό του προϊόντος, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες γραπτές αναφορές (Διάγραμμα 6).

Ιδιαίτερα, νέα ή επίκτητα ανθεκτικά γονίδια ήταν εντελώς απόντα σε όλα τα στοιχεία *Bacillus* που εξετάστηκαν, δηλώνοντας έτσι ότι αυτά τα βακτήρια

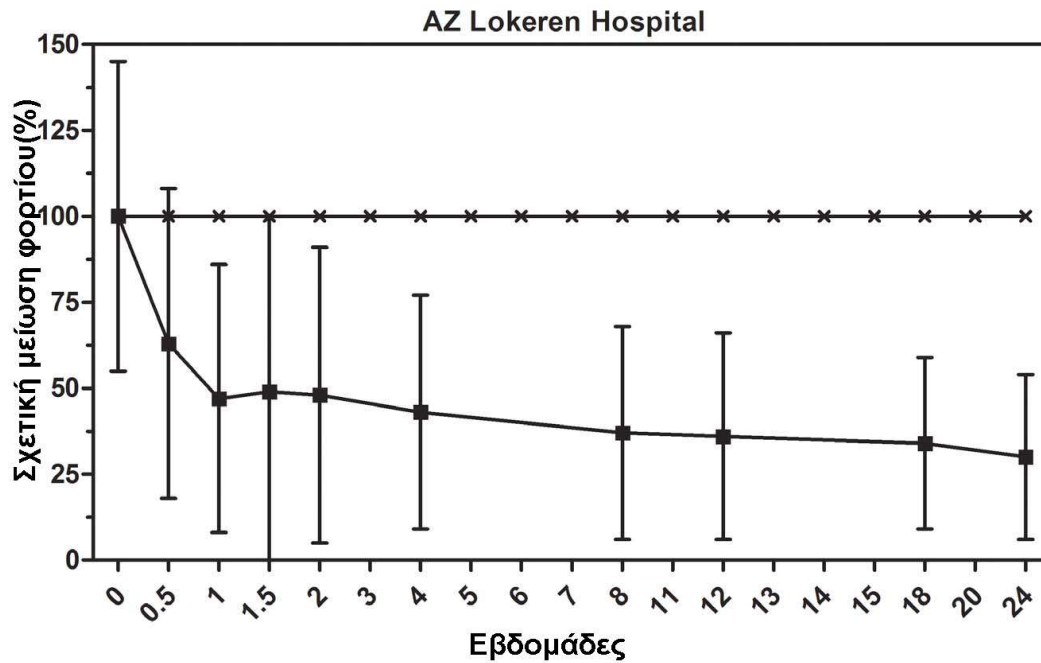
δεν υπέστησαν μεταλλαγή των γονιδίων ή περιπτώσεις μεταφοράς γονιδίων, ακόμη και μετά από 12 μήνες από την εφαρμογή, επιβεβαιώνοντας έτσι τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στις μετρήσεις αντιβιογράμματος.

Συζήτηση

Δεδομένων των πιο πρόσφατων επίσημων αναφορών για την επικράτηση των ΜΦΥ [3] και την εξέλιξη της ανθεκτικότητας των μικροβίων στα αντιβιοτικά [39] και τα απολυμαντικά [20], είναι ξεκάθαρο ότι είναι βαρύνουσας σημασίας να απευθυνθούμε σε νέες και ανθεκτικές στρατηγικές για να αντιμετωπίσουμε μολυσμένες επιφάνειες σε περιβάλλοντα νοσοκομείων. Εκτός από τα μέτρα που αναφέρονται στην από άτομο-σε-άτομο μετάδοση των παθογόνων, οι μολυσμένες επιφάνειες των περιβάλλοντων παρέχουν μία εν δυνάμει πηγή για την μετάδοση πολλών παθογόνων που σχετίζονται με την φροντίδα-υγείας, εξαιτίας της επιμονής τους σε τέτοιες ά-ψυχες επιφάνειες [9,10,40]. Αυτό επισημαίνει την σπουδαιότητα των διαδικασιών καθαρισμού με στόχο να ελεγχθεί το φορτίο των παθογόνων βακτηριδίων που εδρεύουν σε επιφάνειες νοσοκομείων, και κατά συνέπεια, των ΜΦΥ, όπως διαφαίνεται από σημαντικά στοιχεία σχετικά με τα οφέλη της καθαριότητας των νοσοκομείων έναντι της μείωσης ΜΦΥ [18].

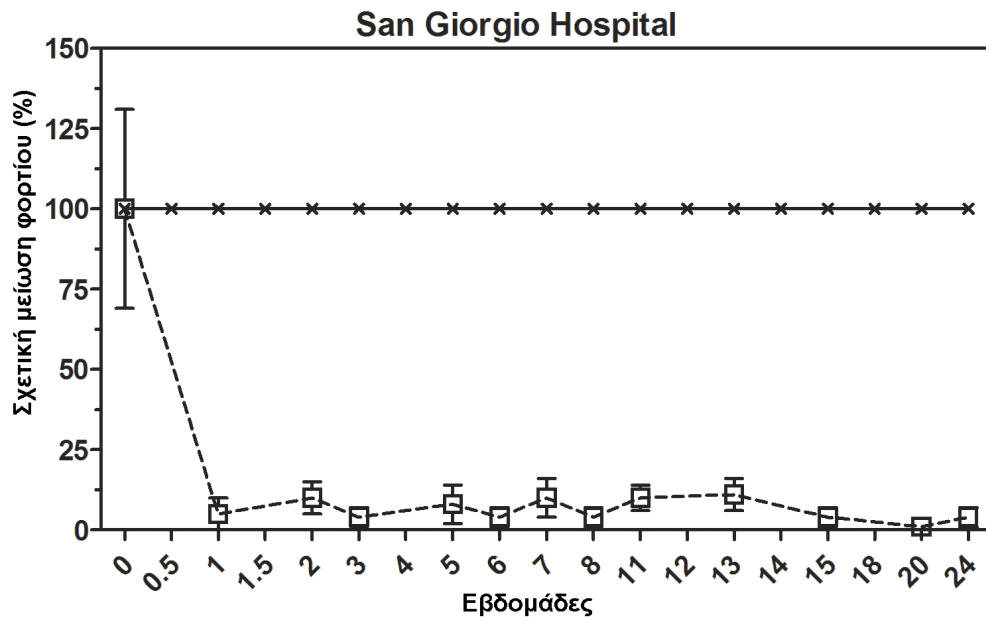
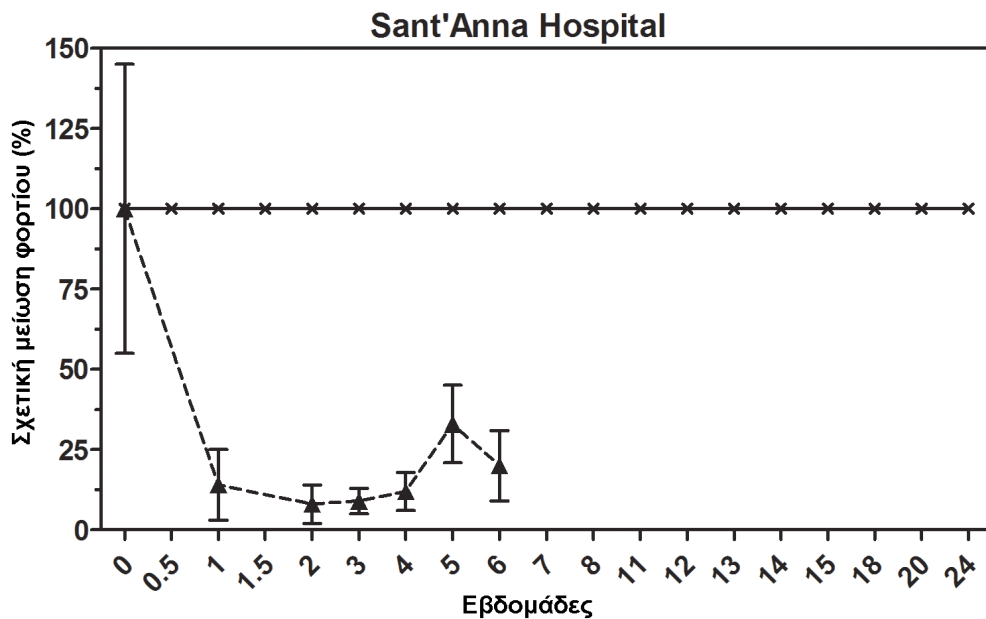
Αυτή η μελέτη διερεύνησε την υπόθεση των Falagas & Makris [22] να χρησιμοποιούνται μη-παθογόνοι μικροοργανισμοί, δηλαδή προβιοτικά, ως μέρος των καθημερινών προϊόντων καθαρισμού για να μειωθεί η εμφάνιση μικροοργανισμών σχετικών με ΜΦΥ στις εγκαταστάσεις μονάδων φροντίδας υγείας. Τα αποτελέσματα σχετικά με την αποδοτικότητα των προβιοτικών για την πρόληψη και την περίθαλψη των μολύνσεων παρατηρήθηκαν και *in vitro* (εργαστηριακά) και *in vivo* (δια ζώσης) [41-43].

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών σχετικών με ΜΦΥ και για την παρούσα μελέτη η επιλογή καθορίστηκε κυρίως από την σχετικότητα και την σχετική αφθονία των μικροοργανισμών στα νοσοκομεία που πρόθυμα συμμετείχαν. Τα Coliforms επιλέχθηκαν ως δείκτης γενικής υγιεινής και αξιολόγησης καθαρισμού. Παρόλο που κάποιες ΜΦΥ είναι συνδεδεμένες με ξαφνικά κρούσματα και κάποιες άλλες δείχνουν μία περισσότερο συνεχή επικράτηση, οι σχετικοί μικροοργανισμοί μπορούν να βρεθούν σε συμπαγείς επιφάνειες σε οποιαδήποτε στιγμή, καθώς φαίνεται στην παρούσα μελέτη. Αυτό σημαίνει ότι οι επιφάνειες δρουν ως αποθηκευτικός χώρος που μπορεί να πυροδοτήσει ένα ξαφνικό κρούσμα όταν μολύνονται οι άνθρωποι και αρχίζουν την εξάπλωση των παθογόνων μεταξύ τους.



Διάγραμμα 3. Το αποτέλεσμα του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού στις μετρήσεις επιφάνειας για *C. difficile*. Οι μετρήσεις επιφάνειας για *C. difficile*. Οι μετρήσεις επιφάνειας αναφέρονται ως σχετικό ποσοστό τοις εκατό της μείωσης σε σύγκριση με τον έλεγχο, οι οποίες καθαρίστηκαν με συμβατικά (απολυμαντικά) προϊόντα καθαρισμού. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στον Πίνακα S4.

doi: 10.1371/journal.pone .0108598.g003

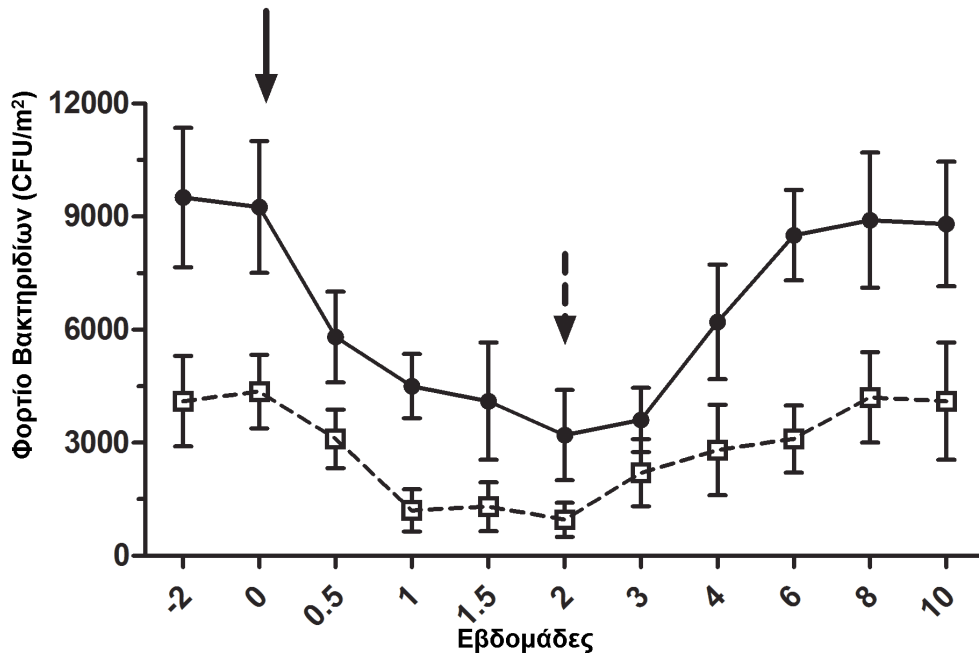
A**B**

Διάγραμμα 4. Το αποτέλεσμα του **μικρο-βιολογικού** καθαρισμού στις μετρήσεις επιφάνειας για *Candida albicans*. Οι μετρήσεις επιφάνειας αναφέρονται ως σχετικό ποσοστό τοις εκατό της μείωσης σε σχέση με τον έλεγχο, οι οποίες καθαρίστηκαν με συμβατικά (απολυμαντικά) προϊόντα καθαρισμού. Η ανάλυση έδειξε ότι τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας S5).

doi: 10.1371/journal.pone .0108598.g004

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να συλλέξουμε επαρκώς ουσιώδεις πληροφορίες από διαφορετικές ανεξάρτητες εγκαταστάσεις μονάδων φροντίδας υγείας και τα 20.000 μικροβιολογικά δείγματα επιφανειών συνεισέφεραν στην σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων. Ωστόσο, το ποσό των αναλύσεων καθιστά αδύνατον να παρουσιάσουμε όλες τις συγκεκριμένες πληροφορίες και παρατηρήσεις σ' αυτήν την μελέτη. Γι' αυτό τον λόγο, δεδομένων των αρκετά συμβατών μέσων **μίκρο-βιολογικών** μετρήσεων ανάμεσα στα αρκετά νοσοκομεία, παρουσιάζονται οι τάσεις που παρατηρήθηκαν στην επιφάνεια της **μίκρο-βιολογίας** με **μίκρο-βιολογικό** καθαρισμό.

Εν γένει, παρατηρήθηκε ότι ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός σε συμπαγείς επιφάνειες έφερε ως αποτέλεσμα μία ξεκάθαρη αλλαγή στην **μίκρο-βιολογία** μέσα σε δύο εβδομάδες. Με εξαίρεση το *Clostridium difficile*, παρατηρήθηκε μία πολύ σημαντική μείωση σε μικροοργανισμούς σχετικούς με **ΜΦΥ**, σε σύγκριση με τον συμβατικό καθαρισμό και απολύμανση. Με δύο εβδομάδες **μίκρο-βιολογικό** καθαρισμό, η μειωμένοι μικροοργανισμοί, που σχετίζονται με **ΜΦΥ** παρέμειναν μόλις επάνω από το όριο ανίχνευσης στο πρωτόκολλο της εξέτασης. Η συνήθης απόκλιση κάποιων τιμών ήταν υψηλή (πιθανόν εξαιτίας μεγάλων διαφορών στον τύπο των επιφανειών που εξετάστηκαν), αλλά ακόμη και έτσι, η διαφορά ήταν ξεκάθαρα σημαντική για την παρουσία των αποτελεσμάτων που απορρέουν από τον **μίκρο-βιολογικό** καθαρισμό σε σύγκριση με τον έλεγχο. Τα αποτελέσματα μας δηλώνουν ότι ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός μείωσε μακράν την παρουσία μικροοργανισμών σχετικών με **ΜΦΥ** σε συμπαγείς επιφάνειες, σε σύγκριση με τις συμβατικές διαδικασίες καθαρισμού, χωρίς να μειώνει σημαντικά τις συνολικές **μίκρο-βιολογικές** μετρήσεις. Επιπλέον, τα στοιχεία μας δείχνουν ότι όταν ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός άλλαξε σε συμβατική διαδικασία, οι μετρήσεις των μικροοργανισμών σχετικών με **ΜΦΥ** ανέβηκαν στα αρχικά (υψηλότερα) επίπεδα που παρατηρήθηκαν στην αρχή του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός έχει επιρροή στις μετρήσεις μικροοργανισμών σχετικών με **ΜΦΥ** και ότι ο **μίκρο-βιολογικός** καθαρισμός απαιτείται να εφαρμόζεται σε τακτική βάση έτσι ώστε να διατηρήσει σταθερά τα μειωμένα επίπεδα των μικροοργανισμών.



Διάγραμμα 5. Χρονική περίοδος των μετρήσεων των επιφανειών για coliforms και *S. aureus*. Διεξήχθη μία δοκιμή σε σχέση με τον χρόνο για coliforms (μαύροι κύκλοι) και *S. aureus* (λευκοί κύκλοι) μετρήσεις στο τμήμα γηριατρικής στο νοσοκομείο AZ Lokeren.

Οι μετρήσεις των επιφανειών που ορίζονται ως CFU/m², έγιναν μετά την εφαρμογή συμβατικού (από την 22^η εβδομάδα ως την εβδομάδα μηδέν -0-) και μικρο-βιολογικού (από την εβδομάδα -0- μηδέν έως την 2^η εβδομάδα) καθαρισμού, και ακολούθησαν από μια μετέπειτα περίοδο συμβατικού καθαρισμού (από την 2^η έως την 10^η εβδομάδα). Η εφαρμογή των προβιοτικών προϊόντων οδήγησε σε σημαντική μείωση στο παθογόνο φορτίο των coliform (p=0,0001) και του *S. aureus* (p=0,003).

Μαύρο βέλος: αρχή του μικρο-βιολογικού καθαρισμού.

Μαύρο διάστικτο βέλος: συμβατικός καθαρισμός.

doi: 10.1371/journal.pone .0108598.g005

Γι' αυτό το λόγο, ο **μικρο-βιολογικός** καθαρισμός είχε ως αποτέλεσμα την μερική μη-μόνιμη αντικατάσταση μικροοργανισμών σχετικών με **ΜΦΥ** από τα ποικίλα *Bacillus* που χρησιμοποιήθηκαν στα **μικρο-βιολογικά** προϊόντα καθαρισμού.

Παρόλο που η παρούσα μελέτη δεν στόχευε να ερευνήσει τους πραγματικούς μηχανισμούς που συμπεριλαμβάνονται στις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην επιφάνεια μικροβίων, μπορούν να γίνουν κάποιοι ισχυρισμοί βάσει των υπάρχοντων γραπτών μελετών. Ο πιο συνήθης σχετικός μηχανισμός που υποστηρίζει το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε είναι πιθανόν να υφίσταται εξαιτίας του ανταγωνιστικού εξαιρούμενου γεγονότος: οι ποικιλίες *Bacillus* που εφαρμόστηκαν στις επιφάνειες μέσα στο διάλυμα καθαρισμού μπορούν να συναγωνιστούν σε σχέση με θρεπτικά συστατικά και χώρο, με τα μικρόβια που ήδη υπάρχουν στις επιφάνειες [44].

Οι Woo & Ann διατύπωσαν ότι η ανταγωνιστική εξαίρεση μπορεί επίσης να από-σταθεροποιήσει συγκεκριμένα **βίο-φίλμ** [44], γεγονός που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη ως αφαίρεση της πλάκας από συγκεκριμένες συμπαγείς επιφάνειες κατόπιν **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού αρκετών εβδομάδων. Τέτοια αφαίρεση **βίο-φίλμ** από συμπαγείς επιφάνειες μέσω **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Ένας άλλος επίσης μηχανισμός είναι πιθανόν να συμβάλλει στις αλλαγές στα μικρόβια με **μίκρο-βιολογικό** καθαρισμό, και επίσης, να αποσταθεροποιεί τον σχηματισμό **βίο-φίλμ**, είναι το αισθητήριο quorum και η quorum σβέση [45]. Η συνεχής τεχνητή εισαγωγή κυρίαρχων μετρήσεων *Bacillus* spp. μέσω των προϊόντων καθαρισμού μπορεί να αποσταθεροποιήσει των δυναμικών **μίκρο-βιολογικών** πληθυσμών και στο **βίο-φίλμ** (π.χ. Πέτρα).

Πίνακας 1. Αντιβιογράμματα του *Bacillus* spp. από τα προϊόντα καθαρισμού και τα στοιχεία.

| | Διαμετρική Ζώνη - Ερμηγεία Κριτηρίων (mm) | | | | |
|---------------------------------|---|-------------------|-----------|-----------------|--------------|
| | Beta-lactams | | | Aminoglycosides | Lincosamides |
| | Penicillin | Cefoperazone | Cefalotin | Gentamicin | Clindamycin |
| | (10 U) | (30 µg) | (30 µg) | (10 µg) | (2 µg) |
| ATCC 6633 | 7 R ^a | 20 I ^b | 30 S | 25 S | 25 S |
| PCHS προϊόν | 14 R | 19 I | 24 S | 24 S | 18 I |
| <i>Bacillus</i> spp. στοιχείο 1 | 12 R | 19 I | 20 S | 25 S | 20 I |
| <i>Bacillus</i> spp. στοιχείο 2 | 15 R | 20 I | 30 S | 25 S | 16 I |
| <i>Bacillus</i> spp. στοιχείο 3 | 10 R | 30 S ^c | 35 S | 30 S | 25 S |

a Ανθεκτικό

b Μέσο

c Ευαίσθητο

Σημείωση: για τα κριτήρια αναφοράς βλ. Πίνακα 1.

Τα αντιβιογράμματα διεξήχθησαν σε *Bacilli* από PCHS προϊόντα και στοιχεία, με ATCC 6633 ποικιλία ως αναφορά.

Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε διάμετρο (που εκφράζεται σε mm) των ζωνών συστολής και τα αντίστοιχα επεξηγηματικά κριτήρια CLSI [38]

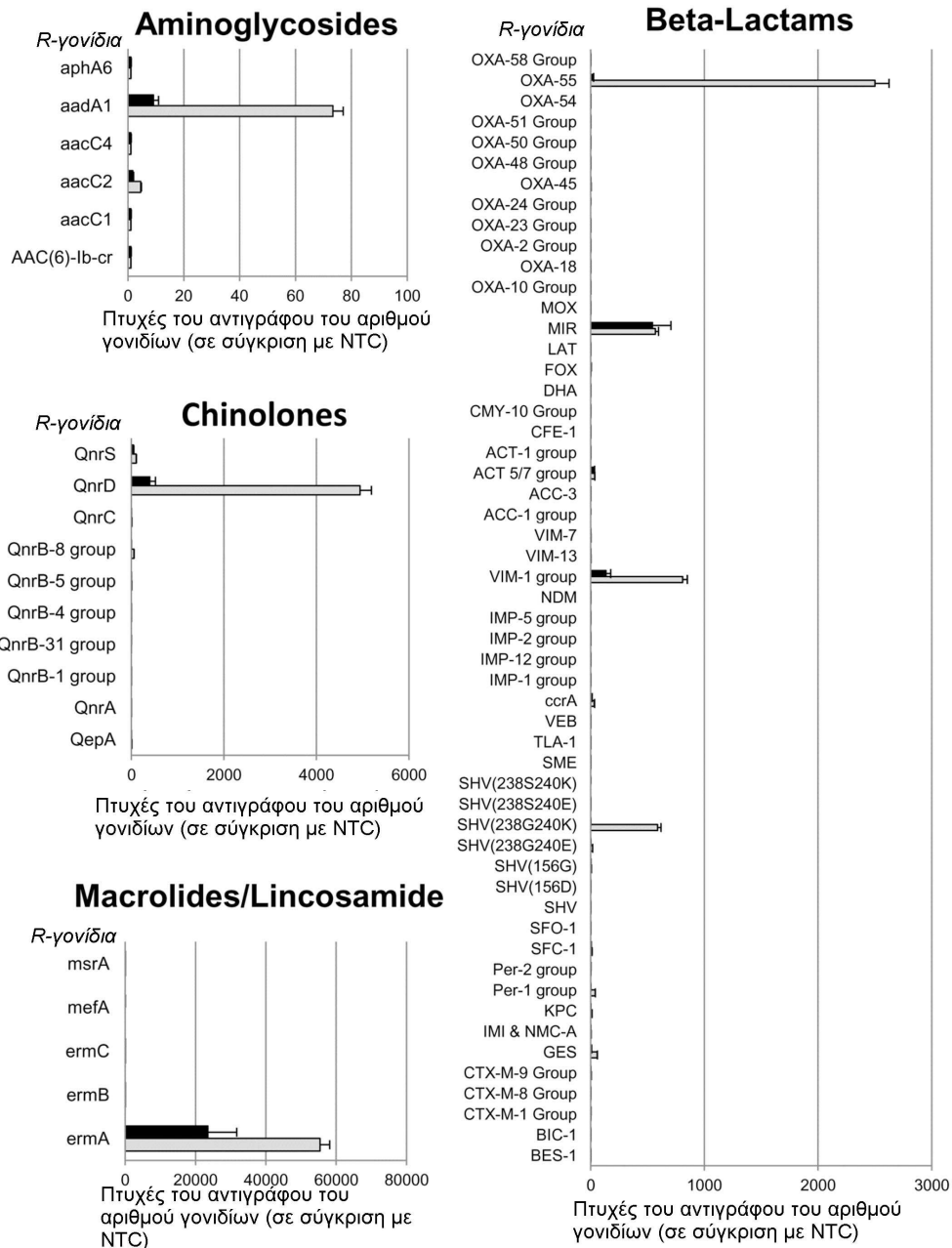
(Πίνακας S1).

doi:10.1371/journal.pone.0108598.t001

Τα αντιβιογράμματα διεξήχθησαν στα *Bacilli* και PCHS προϊόντα και στοιχεία, με ATCC 6633 μέσο ως αναφορά. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως διάμετρος (που εκφράζεται σε mm) από τις ζώνες συστολής και τα αντιπροσωπευτικά ερμηνευτικά κριτήρια, σε ακολουθία με την αναφορά κριτηρίων CLSI [38] (Πίνακας S1).

Διάγραμμα 6. Προφίλ μέτρησης αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας γονιδίων με qPCR. Το DNA του *Bacillus* spp. από τα προϊόντα καθαρισμού (Πρωτότυπα) και από τις 20 *Bacillus* spp. αποικίες που απομονώθηκαν από τις επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν έως 12 μήνες μετά την αρχή του πρωτόκολλου καθαρισμού (Στοιχεία) αναλύθηκαν με qPCR Microarray, για να ανιχνευθεί η παρουσία γονιδίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (R γονίδια). Το DNA από την ποικιλία *E. coli* JM101 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός έλεγχος (NTC).

■ Στοιχεία □ Πρωτότυπα



Τα αποτελέσματα αναφέρονταν ως πτυχές του αντίγραφου του αριθμού γονιδίων συγκρίνοντας τις ανιχνευθείσες τιμές με αυτές που αποκομίσθηκαν στον αρνητικό έλεγχο DNA, και οι δύο ομαλοποιήθηκαν για τον αριθμό βακτηριακών κυττάρων. Αυτοί οι κωδικοί γονιδίων για αντιβιοτικά που δεν περιέχονται στο διάγραμμα (π.χ. vancomycin, tetracyclins) ήταν αρνητικά και για τις Πρωτότυπα και για τις επιλογές Στοιχείων. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως μέσο επίπεδο απόκλισης 6.

doi: 10.1371/journal.pone .0108598.g006

Δεδομένου του γενικού αποτελέσματος του **μίκρο-βιολογικού** καθαρισμού σε αρκετούς μικροοργανισμούς σχετικούς με **ΜΦΥ**, είναι πιθανόν ότι μη-

επιλεκτικά αποτελέσματα όπως η ανταγωνιστική εξαίρεση και το quorum αισθητήριο είναι οι σημαντικότεροι εμπλεκόμενοι οργανισμοί. Εκτός από αυτούς τους γενικούς μηχανισμούς, άλλες πιο συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μπορούν να συμβάλλουν στο αποτέλεσμα της μείωσης σε έναν ή περισσότερους μικροοργανισμούς σχετικούς με ΜΦΥ. Για παράδειγμα η παραγωγή είτε bacteriocins [46] ή κάποιων ενζύμων γνωστών ότι παράγονται από Bacillus spp. πιθανόν να επηρεάσουν άλλους οργανισμούς σε πιο ευρύ φάσμα. Σχετικά με το Clostridium, οι συγγραφείς δηλώνουν ότι τα cortex-lytic ένζυμα που περιέχονται στην εκκόλαψη των σπορίων Bacillus [47] στα **μικρο-βιολογικά** προϊόντα καθαρισμού μπορούν επίσης να προκαλέσουν την εκκόλαψη των σπορίων Clostridium στις επιφάνειες. Τα εκκολαφθέντα κύτταρα Clostridium μπορούν τελικά να θανατωθούν από το οξυγόνο ή να υποστούν ανταγωνιστική εξαίρεση. Ασχετα με τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς αυτή η μελέτη δείχνει ότι, ο **μικρο-βιολογικός** καθαρισμός στις εγκαταστάσεις φροντίδας υγείας καταφέρνει να μειώσει σημαντικά τις μετρήσεις επιφάνειας ποικίλων μικροοργανισμών σχετιζόμενων με ΜΦΥ.

Το σημαντικότερο ερώτημα αφορά την ασφάλεια της εφαρμογής του **μικρο-βιολογικού** καθαρισμού, ως σύστημα **βίο-ελέγχου** στις εγκαταστάσεις φροντίδας υγείας. Προφανώς, η αναγνώριση και η αξιολόγηση ασφάλειας των ποικίλων βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στα προϊόντα είναι πρωτεύουσας σημασίας, όπως επίσης η διαδικασίες παραγωγής που εμπλέκονται καθ' όλη την αλυσίδα παραγωγής. Οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη (Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, και Bacillus megaterium), ήταν στην κατηγορία των τροφίμων, για τα οποία υπήρχαν από τον κατασκευαστή δεδομένα τοξικότητας, και είναι επίσης γνωστόν ότι είναι βλαβερά για ανθρώπους [48-51]. Επιπλέον, όλες οι διαδικασίες ελέγχου ποιότητας και παραγωγής ήταν πιστοποιημένες ISO9001:2008. Επίσης η χρήση των προβιοτικών για αρκετές βίο-τεχνολογικές και βίο-φαρμακευτικές εφαρμογές, καθώς φαίνεται από μία πολύ πρόσφατη χρήση του B. subtilis ως παράγοντα βίο-ελέγχου στην υδροπονία [52], την γεωργία [53-55], ως φάρμακο [56-57] ή, στην μορφή σπορίου ως σύστημα μετάδοσης για την ανάπτυξη νέων εμβολίων [58-63] έχει μελετηθεί και ελεγχθεί.

Ωστόσο, είναι ξεκάθαρο ότι ο **μικρο-βιολογικός** καθορισμός από μόνος του δεν θα λύσει το πρόβλημα των ΜΦΥ. Υπάρχουν απτά στοιχεία που δηλώνουν ότι ένα ορθό πρόγραμμα υγιεινής χεριών σε περιβάλλοντα φροντίδας υγείας αντιπροσωπεύει μια αποτελεσματική συμπεριφορά με τον σκοπό της μείωσης των ΜΦΥ [64,65]. Έτσι ο **μικρο-βιολογικός** καθαρισμός είναι απαραίτητο να είναι μέρος ενός σφαιρικού πρωτοκόλλου υγιεινής, όπως το προτεινόμενο μικρο-βιολογικό σύστημα καθαρισμού (PCHS), το οποίο χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο οριοθετεί σε ποιους συγκεκριμένους χώρους ή καταστάσεις απαιτείται ορθή απολύμανση με **μικρο-βιολογικό** καθαρισμό και συνάμα οδηγίες για την ορθή υγιεινή των χεριών ή την απομόνωση των μολυσμένων ανθρώπων. Σποραδικά ξαφνικά κρούσματα όπως οι διαδοσόμενες μολύνσεις μπορεί να απαιτούν ιδιαίτερα μέτρα τα οποία δεν ακολουθούν τον συνήθη καθαρισμό ή τις απολυμαντικές διαδικασίες. Παρά το αποτέλεσμα της μείωσης αρκετών ΜΦΥ συναφών μικροοργανισμών, τα

μίκρο-βιολογικά προϊόντα καθαρισμού δεν ενδείκνυται να χρησιμοποιούνται ή να θεωρούνται απολυμαντικά. Πράγματι, όταν μία επιφάνεια μολύνεται ενεργά, απαιτείται απολύμανση, ιδιαίτερα για τις επιφάνειες που βρίσκονται σε περιοχές υψηλού κινδύνου. Ο καθαρισμός με προϊόντα με βάση τα προβιοτικά μπορεί να ξεπεράσει την περιορισμένη δράση των παραδοσιακών απολυμαντικών, μειώνοντας την επανεμφάνιση των παθογόνων φορτίων στις επιφάνειες, και αφαιρώντας τα **βίο-φίλμ** τα οποία μπορεί να δράσουν ως καταφύγιο για άλλα παθογόνα. Τα προϊόντα με βάση τα προβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη είναι κατάλληλα μόνο για καθαρισμό, υποδεικνύοντας έτσι ότι όταν είναι απαραίτητη κάποια απολύμανση, πρέπει οπωσδήποτε να χρησιμοποιείται απολυμαντικό, ωστόσο ο συνδυασμός με καθαρισμό με βάση τα προβιοτικά θα επιτρέψει βέλτιστη μακροπρόθεσμη συντήρηση χαμηλής βαθμίδας μόλυνσης.

Για να αξιολογηθεί η ευαισθησία ή η ανθεκτικότητα των ποικίλων *Bacillus* στα αντιβιοτικά, εφαρμόσαμε πρόσφατα την έρευνά μας αναλύοντας τεστ με αντιβιογράμματα, τα οποία δρουν στις αποικίες των *Bacillus* spp. Προερχόμενα από τα ίδια δείγματα επιφανειών (π.χ. πάτωμα), οι οποίες παρακολουθούνταν σε περιβάλλοντα νοσοκομείου. Τα πρώτα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι οι απομονωμένες ποικιλίες *Bacillus* spp. είναι ευπαθείς στα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν, με εξαίρεση αυτών που είναι φύσει ανθεκτικά οι *Bacillus* spp., όπως φαίνεται από τα αντιβιογράμματα που εκτελέστηκαν βάσει του επιπέδου ποικιλίας ATCC.

Γνωρίζουμε ότι η μελέτη εστίασε σε περιορισμένο αριθμό μικροοργανισμών, και ότι οι τεχνικές που εξαρτώνται από την καλλιέργεια παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι απλές αποικίες πιθανόν δεν είναι πλήρως αντιπροσωπευτικές σε σχέση με τα γονίδια βακτηριδίων που αναλύθηκαν. Όσον αφορά την ασφάλεια με στόχο την αύξηση της αντιπροσωπευτικότητας των αποτελεσμάτων, 20 στοιχεία *Bacillus* εξετάστηκαν επίσης με μέτρηση qPCR, η οποία σχεδιάστηκε να αξιολογεί ταυτόχρονα την παρουσία, 87 διαφορετικών ανθεκτικών γονιδίων. Εκτός από τον υψηλό αριθμό των παραγόντων ανθεκτικότητας, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ωφέλημα την υψηλή ευαισθησία, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση πολύ λίγων αντιτύπων του γονιδίου-στόχου, επιτρέποντας έτσι την ταυτοποίηση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων, ακόμη και όταν ένας πολύ μικρός αριθμός βακτηριακών κυττάρων, μέσα στο ίδιο δείγμα, είναι θετικά στην ανθεκτικότητα ως προς τα αντιβιοτικά. Η αξιοπιστία αυτής της μέτρησης για την ανάλυση των ποικιλιών *Bacillus* υποστηρίζεται από την ανίχνευση, όπως είναι αναμενόμενο, αυτών των ανθεκτικών γονιδίων που είναι γνωστόν ότι βρίσκονται στον *Bacillus* spp. που περιέχεται στον σχηματισμό του προϊόντος καθαρισμού που χρησιμοποιείται [66].

Παρόλο που αυτές οι μετρήσεις διεξήχθησαν μόνον σε 20 *Bacillus* spp. ποικιλίες, αυτά τα προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν φαίνεται να υπάρχει αφομοίωση νέων ανθεκτικών γονιδίων, ακόμη και σε περίοδο 12 μηνών, ισχυροποιώντας έτσι την υπόθεση ότι η χρήση σπορίων *Bacillus* στα προϊόντα καθαρισμού μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής. Από την άλλη, τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι αυτή η μέθοδος μπορεί να είναι αξιόπιστη

για την εκτίμηση των παραγόντων αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας σε *Bacillus*, και καθορίζει αυτή την μέτρηση ως μία σημαντική εφαρμογή για μελλοντικές μελέτες που επίσης εστιάζουν στην ασφάλεια.

Συμπεράσματα

Δεδομένης της πρόσφατης και ταχείας εξέλιξης των πολύ-ανθεκτικών παθογόνων στις εγκαταστάσεις φροντίδας υγείας, είναι αναγκαίο να υπάρχουν αποτελεσματικά και ανθεκτικά για τον καθαρισμό και τα χημικά απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται σήμερα. Αυτή η μελέτη παρουσιάζει ότι ο μικροβιολογικός καθαρισμός (με βάση τα προβιοτικά) είναι πιο αποτελεσματικός στην μακροπρόθεσμη μείωση του αριθμού των μικροοργανισμών που σχετίζονται με **ΜΦΥ** συγκριτικά με συμβατικά προϊόντα καθαρισμού, ακόμη κι εκείνα που περιέχουν απολυμαντικά μόρια όπως η χλωρίνη. Οι πρώτες ενδείξεις στα ποσοστά των **ΜΦΥ** στις δοκιμές στα νοσοκομεία που παρακολουθούνταν σε συνεχή βάση καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης, είναι πολύ ελπιδοφόρα και μπορούν να ανοίξουν τον δρόμο για μία καινοτόμο και αποδοτική σε σχέση με το κόστος, στρατηγική, ώστε να αλληλεπιδράσει ή να (βίο)ελέγξει τα παθογόνα που σχετίζονται με την φροντίδα υγείας. Στο κρίσιμο σημείο της διαχείρισης, είναι απαραίτητο να ληφθούν αποφάσεις ως προς το αν ο ασθενής πρέπει να μείνει σε ένα περιβάλλον που ορίζεται από μικροοργανισμούς στην κατηγορία τροφίμων ή σε ένα περιβάλλον το οποίο τρέφει ένα ανώτερο επίπεδο από αυξανόμενα ανθεκτικά παθογόνα.

Ενισχυτικές πληροφορίες

Πίνακας S1 – Κριτήρια αναφοράς για την ερμηνεία των ζωνών συστολής στην εξέταση της διάχυσης του δίσκου της αντιμικροβιολογικής ευαισθησίας. Ο πίνακας δείχνει τα ερμηνευτικά κριτήρια διάχυσης δίσκου για την συσχέτιση (εκφράζεται σε mm) των ζωνών συστολής με την αντίστοιχη ερμηνεία, αναφέρεται ως Ευαίσθητη (E), Μέση (M) και Ανθεκτική (A), σύμφωνα με τα αναφορικά κριτήρια CLSI [38]. (XLSX)

Πίνακας S2 – Στατιστική ανάλυση για την μείωση των φορτίων coliform. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως MPE/m². (XLSX)

Πίνακας S3 – Στατιστική ανάλυση για την μείωση του φορτίου *Staphylococcus aureus*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως MPE/m². (XLSX)

Πίνακας S4 – Στατιστική ανάλυση για την μείωση του φορτίου των *Clostridium difficile*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως MPE/m². (XLSX)

Πίνακας S5 – Στατιστική ανάλυση για την μείωση του φορτίου *Candida albicans*.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως MPE/m² . (XLSX)

Συνομογραφίες:

- **ΜΦΥ:** Μολύνσεις που σχετίζονται με την Φροντίδα Υγείας
- **ΚΕΝΠ:** Κέντρα Ελέγχου Νοσημάτων και Πρόληψης
- **ΠΣΥΚ:** Προβιοτικό Σύστημα Υγιεινούς Καθαρισμού
- **ΑΑΚΟ:** Αντίγραφο Ανίχνευσης και Καταμέτρησης Οργανισμών
- **ΣΜΑ:** Σχηματισμοί Μονάδων Αποικιών
- **MPE:** Μίκρο-βιολογική επιφανειών

Αρωγή Συγγραφέων

Σύλληψη και σχεδιασμός των πειραμάτων: RT PA PGB EC SM. Διεξαγωγή πειραμάτων: AV RT AF EC. Ανάλυση των πληροφοριών: SM RT AF EC DP.

Παραπομπές :

1. Burke JP (2003) Infection control - a problem for patient safety. *N Engl J Med* 348: 651–656.
2. Allegranzi B, Nejad SB, Castillejos GG, Kilpatrick C, Kelley E, et al Clean Care is Safer Care Team (2011) Report on the Burden of Endemic Health Care–Associated Infection Worldwide. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Available: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501507_eng.pdf
3. Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Diaz Ho'gberg L (2013) Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control. Available: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-usepps.pdf>.
4. Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Jr., Horan TC, Gaynes RP, et al. (2007) Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. Hospitals, 2002. *Public Health Rep* 122: 160–166.
5. Scott D (2009) The direct medical costs of Healthcare-Associated Infections in U.S. Hospitals and the benefits of prevention. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Available: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott_costpaper.pdf.
6. Davis GS, Sevdalis N, Drumright LN (2014) Spatial and temporal analyses to investigate infectious disease transmission within healthcare settings. *J Hosp Infect* 86: 227–243.
7. Gaudart J, Cloutman-Green E, Guillas S, D'Arcy N, Hartley JC, et al. (2013) Healthcare environments and spatial variability of healthcare associated infection risk: cross-sectional surveys. *PLoS One* 8: e76249.

8. Hota B (2004) Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis* 39: 1182–1189.
9. Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6: 130.
10. Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL (2013) Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control* 41: S6–11.
11. Rutala WA, Weber DJ (2005) The benefits of surface disinfection. *Am J Infect Control* 33: 434–435.
12. Dettenkofer M, Spencer RC (2007) Importance of environmental decontamination—a critical view. *J Hosp Infect* 65 Suppl 2: 55–57.
13. Rutala WA (1996) APIC guideline for selection and use of disinfectants. 1994, 1995, and 1996 APIC Guidelines Committee. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. *Am J Infect Control* 24: 313–342.
14. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR (1999) Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20: 250–278.
15. WHO/CDS/CSR/EPH. Prevention of Hospital-acquired infections; a practical guide. Vol. 12, 2002.
16. Sehulster L, Chinn RY, Cdc, Hicpac (2003) Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep* 52: 1–42.
17. Rutala WA, Weber DJ, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008) Guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities. http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/toc.html, Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
18. Dancer SJ (2009) The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect* 73: 378–385.
19. Weber DJ, Rutala WA (2013) Assessing the risk of disease transmission to patients when there is a failure to follow recommended disinfection and sterilization guidelines. *Am J Infect Control* 41: S67–71.
20. McDonnell G, Russell AD (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12: 147–179.
21. Frabetti A, Vandini A, Balboni P, Triolo F, Mazzacane S (2009) Experimental evaluation of the efficacy of sanitation procedures in operating rooms. *Am J Infect Control* 37: 658–664.
22. Falagas ME, Makris GC (2009) Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *J Hosp Infect* 71: 301–306.
23. Gause GF (1932) Experimental studies on the struggle for existence. *J Exp Biol* 9: 389–402.

24. Hardin G (1960) The competitive exclusion principle. *Science* 131: 1292–1297.
25. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 8: 15–25.
26. Gatesoupe FJ (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147–165.
27. Temmerman R, Vervaeren H, Nosedá B, Boon N, Verstraete W (2007) Inhibition of *Legionella pneumophila* by *Bacillus* sp. *Eng Life Science* 7: 1–8.
28. Rodrigues L, van der Mei H, Teixeira JA, Oliveira R (2004) Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 306–311.
29. Rodrigues L, van der Mei HC, Teixeira J, Oliveira R (2004) Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Appl Environ Microbiol* 70: 4408–4410.
30. Rodrigues L, van der Mei H, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R (2006) Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 107–112.
31. Rodrigues LR, Banat IM, van der Mei HC, Teixeira JA, Oliveira R (2006) Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *J Appl Microbiol* 100: 470–480.
32. Walencka E, Rozalska S, Sadowska B, Rozalska B (2008) The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol (Praha)* 53: 61–66.
33. Bauer AW, Perry DM, Kirby WM (1959) Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci; an analysis of technique and results. *A M A Arch Intern Med* 104: 208–216.
34. Kirby WM, Yoshihara GM, Sundsted KS, Warren JH (1957) Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiot Annu 1956–1957*:892–897.
35. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493–496.
36. CLSI M45A (2006) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).
37. CLSI M2-A9 (2009) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. 9th ed. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
38. CLSI M100-S20 (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
39. Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ (2013) Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* 13: 632–642.
40. Donskey C (2013) Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections? *Am J Infect Control* 41: S12–S19.
41. Shu M, Wang Y, Yu J, Kuo S, Coda A, et al. (2013) Fermentation of

- Propionibacterium acnes, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PLoS One 8: e55380.
42. Levkovich T, Poutahidis T, Smillie C, Varian BJ, Ibrahim YM, et al. (2013) Probiotic bacteria induce a 'glow of health'. PLoS One 8: e53867.
 43. Ohlsson C, Engdahl C, Fak F, Andersson A, Windahl SH, et al. (2014) Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. PLoS One 9: e92368.
 44. Woo J, Ahn J (2013) Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. Lett Appl Microbiol 56:307–313.
 45. Christiaen SE, Matthijs N, Zhang XH, Nelis HJ, Bossier P, et al. (2014) Bacteria that inhibit quorum sensing decrease biofilm formation and virulence in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Pathog Dis 70: 271–279.
 46. Beric T, Stankovic S, Draganic V, Kojic M, Lozo J, et al. (2013) Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from Bacillus licheniformis VPS50.2 isolated from soil sample. J Appl Microbiol.
 47. Ustok FI, Packman LC, Lowe CR, Christie G (2014) Spore germination mediated by Bacillus megaterium QM B1551 SleL and YpeB. J Bacteriol 196: 1045–1054.
 48. de Boer AS, Diderichsen B (1991) On the safety of Bacillus subtilis and B. amyloliquefaciens: a review. Appl Microbiol Biotechnol 36: 1–4.
 49. Leonel Ochoa-Solano J, Olmos-Soto J (2006) The functional property of Bacillus for shrimp feeds. Food Microbiol 23: 519–525.
 50. Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, et al. (2007) Bacillus megaterium—from simple soil bacterium to industrial protein production host. Appl Microbiol Biotechnol 76: 957–967.
 51. Porwal S, Lal S, Cheema S, Kalia VC (2009) Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in Bacillus. PLoS One 4: e4438.
 52. Ran C, Carrias A, Williams MA, Capps N, Dan BC, et al. (2012) Identification of Bacillus strains for biological control of catfish pathogens. PLoS One 7:e45793.
 53. Al-Ajlani MM, Sheikh MA, Ahmad Z, Hasnain S (2007) Production of surfactin from Bacillus subtilis MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. Microb Cell Fact 6: 17.
 54. Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, et al. (2014) Antagonistic Action of Bacillus subtilis Strain SG6 on Fusarium graminearum. PLoS One 9: e92486.
 55. Adam M, Heuer H, Hallmann J (2014) Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. PLoS One 9: e90402.
 56. Barnes AG, Cerovic V, Hobson PS, Klavinskis LS (2007) Bacillus subtilis spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. Eur J Immunol 37: 1538–1547.
 57. de Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RC, Amorim JH, et al. (2014) Bacillus subtilis spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. PLoS One 9: e87454.
 58. Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, et al. (2010)

- Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine* 28: 1021–1030.
59. Lee S, Belitsky BR, Brown DW, Brinker JP, Kerstein KO, et al. (2010) Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 28: 6658–6665.
60. Amuguni JH, Lee S, Kerstein KO, Brown DW, Belitsky BR, et al. (2011) Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. *Vaccine* 29: 4778–4784.
61. Permpoonpattana P, Hong HA, Phetcharaburanin J, Huang JM, Cook J, et al. (2011) Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. *Infect Immun* 79: 2295–2302.
62. Amuguni H, Lee S, Kerstein K, Brown D, Belitsky B, et al. (2012) Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. *Microbes Infect* 14: 447–456.
63. Hinc K, Stasilojc M, Piatek I, Peszynska-Sularz G, Istitato R, et al. (2014) Mucosal Adjuvant Activity of IL-2 Presenting Spores of *Bacillus subtilis* in a Murine Model of *Helicobacter pylori* Vaccination. *PLoS One* 9: e95187.
64. Chen YC, Sheng WH, Wang JT, Chang SC, Lin HC, et al. (2011) Effectiveness and limitations of hand hygiene promotion on decreasing healthcare-associated infections. *PLoS One* 6: e27163.
65. Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, et al. (2000) Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. *Infection Control Programme. Lancet* 356: 1307–1312.
66. Larsen N, Stuer-Lauridsen B, Cantor MD, Nielsen B, Brockmann E, et al. (2014) Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as a probiotic additives in pig feed. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 1105–1118.