CONTROLLARE IL MICROBIOTA RESISTENTE IN AMBIENTE OSPEDALIERO: IL SISTEMA "PCHS"

E. Caselli

CIAS Research Centre
Sezione Microbiologia & Genetica Medica
Dipartimento di Scienze Mediche
Università di Ferrara

BACKGROUND



Le infezioni correlate all'assistenza (Healthcare Associated Infections, **HAI**) sono un problema globale (15% pazienti).
La **contaminazione microbica delle superfici** nosocomiali contribuisce alla trasmissione delle HAI.

Oltre **4 milioni pazienti** con HAI in Europa ogni anno. Almeno **37.000 decessi** come diretta conseguenza di HAI.



I patogeni responsabili delle **HAI** sono spesso **MDR** o **PanDR**: MRSA, ESBL, KPC, Colistin…



Finora, il controllo della contaminazione superficiale è stato effettuato mediante sanificazione convenzionale. Limiti: non previene la **ricontaminazione,** può favorire la **selezione** di specie resistenti (i.e. clorexidina induce ColR in KPC), ha un forte impatto ambientale.

Metodi alternativi sostenibili → abbassare **stabilmente** la contaminazione (inibendo la ricontaminazione); garantire **sicurezza** d'uso e basso **impatto ambientale**; evitare selezione di **resistenze** (metodi capaci di **monitorare il fenomeno** e di **individuarne in modo preciso e veloce** la comparsa).

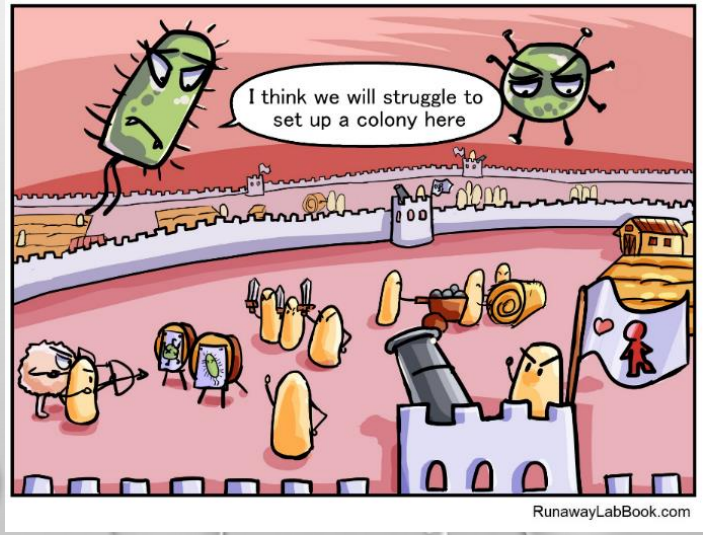
HUMAN MICROBIOME PROJECT

Salute ambientale «ripensata» alla luce delle acquisizioni sul microbioma: piuttosto della rimozione di tutti i patogeni, appare più efficace sostituire i patogeni con microrganismi benefici che ne ostacolano la colonizzazione (replacement)

Microbiome project:
i batteri «buoni» spiazzano quelli «cattivi»
ANTAGONISMO COMPETITIVO

PCHS (***Probiotic Cleaning Hygiene System***): sistema di sanificazione basato sull'uso di detergenti ecosostenibili contenenti spore di batteri probiotici del genere ***Bacillus***





BACKGROUND



Genere *Bacillus*: batteri ubiquitari, presenti in suolo, acqua, intestino umano e animale.
Tranne 2 specie (B. anthracis e B. cereus) tutte le specie del genere sono **APATOGENE** (EFSA risk class = 1)

Le spore di *Bacillus* hanno una lunga storia di utilizzo «safe» nell'uomo

Preparazione cibi: Natto, Doenjang (cibi tradizionali giapponesi e coreani), ottenuti per fermentazione della soia da parte di *B. subtilis*, variante *natto*. Il prodotto finale contiene fino a 10^8 bacilli/gr!



Terapia: prevenzione disturbi GI o ripristino flora GI dopo trattamento antibiotico (Enterogermina, Bactisubtil, Biocult, Biosporin, Bispan, Fora-balance, ecc).





Agricoltura: biofungicida (es. Serenade, Bayer)



Allevamenti: integratori per prevenzione malattie.

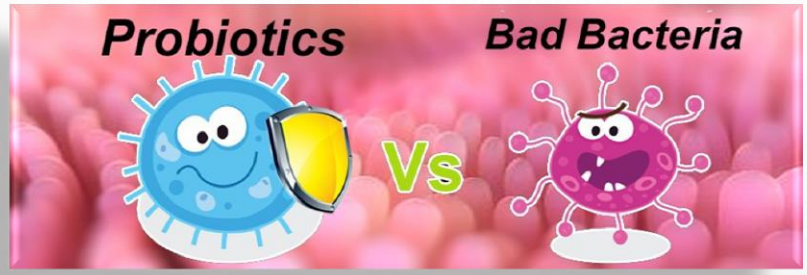




Uso sperimentale: ne1966 Esercito USA libero miliardi di spore di *B. subtilis* nella metropolitana di NY, per simulare un attacco batteriologico: nessun caso di infezione riportato.



SCOPI RICERCA

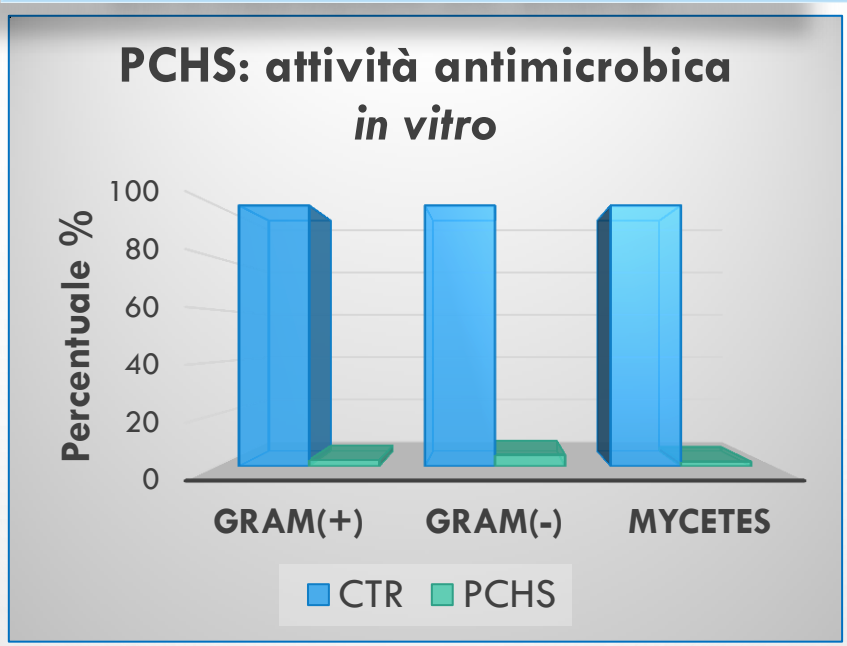


EFFICACIA *in vitro*

EFFICACIA *on field*

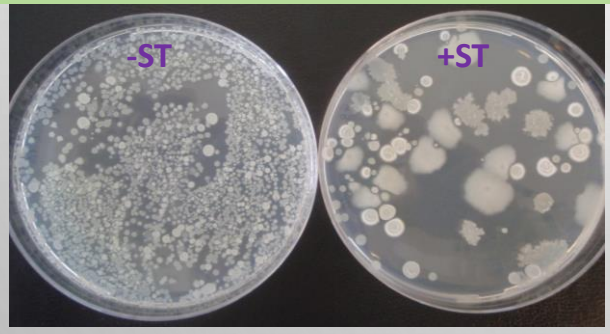
SICUREZZA

EFFICACIA *in vitro*



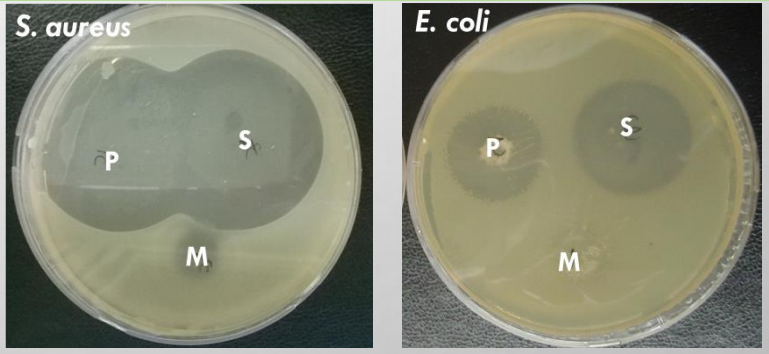
Inibizione crescita batteri e miceti in co-coltura

SPORE di PCHS-*Bacilli* germinano su superfici asciutte



A 24h dalla semina su superficie: solo il 20% resta spora, il restante 80% sono cellule vegetative

PCHS-*Bacilli* vegetativi producono sostanze antibatteriche

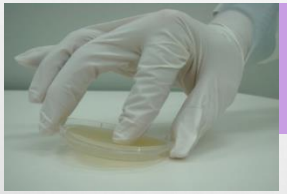


Produzione composti antimicrobici (aloni di inibizione crescita a 24 h) da parte di *B. subtilis* (S), *pumilus* (P) e *megaterium* (M).

EFFICACIA *on field*

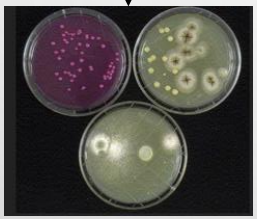
1. PCHS *vs* sanificazione tradizionale

Studio multicentrico randomizzato controllato.
3 ospedali (1 Belgio, 2 Italia), analisi microbiota settimanali per **6 mesi**.



ANALISI MICROBIOLOGICHE

Microbiologia convenzionale:
conta CFU (4 patogeni) + Antibiogrammi



Superfici testate: pavimento, pediera letto e lavabo (ogni punto in duplicato).
Analizzati circa **20.000 campioni microbiologici.**

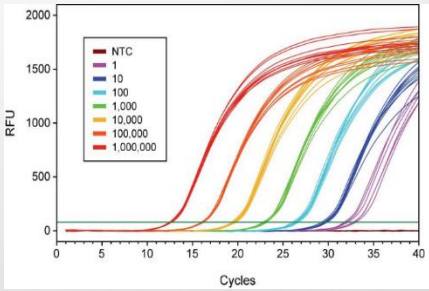
METODI: Analisi contaminazione superficiale mediante CFU count (piastre Rodac).

2. Pre-post intervention

Studio monocentrico (1 ospedale, Ferrara). Microbiota analizzato mensilmente **PRIMA** e **DOPO** l'applicazione del PCHS.

\+ **ANALISI MOLECOLARI**





DNA → PCR e qPCR evidenziare: carica batterica totale, presenza di *Bacillus*, geni di farmaco-resistenza (messi a punto 6 nuovi sistemi di analisi molecolare)

Superfici testate: pavimento, pediera letto e lavabo (ogni punto in duplicato).
Analizzati circa **1.000 campioni**.

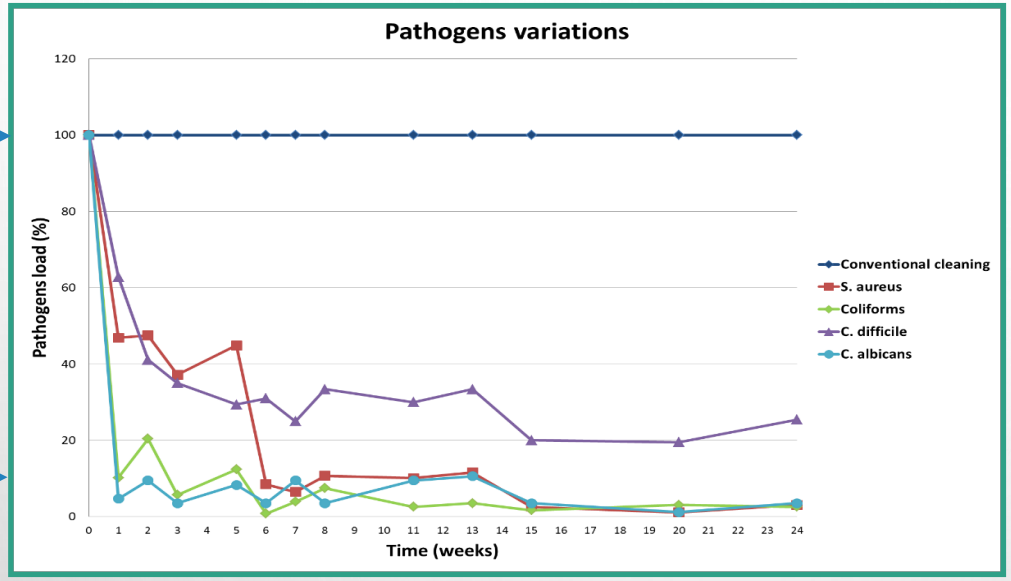
METODI: Analisi mediante CFU count (6 patogeni) + antibiogrammi + analisi molecolare.

RISULTATI

PCHS abbatte stabilmente la carica patogena sulle superfici trattate
(*Vandini et al., PLoS One 2014; Caselli et al., PLoS One 2016*).

Detergenti chimici

PCHS



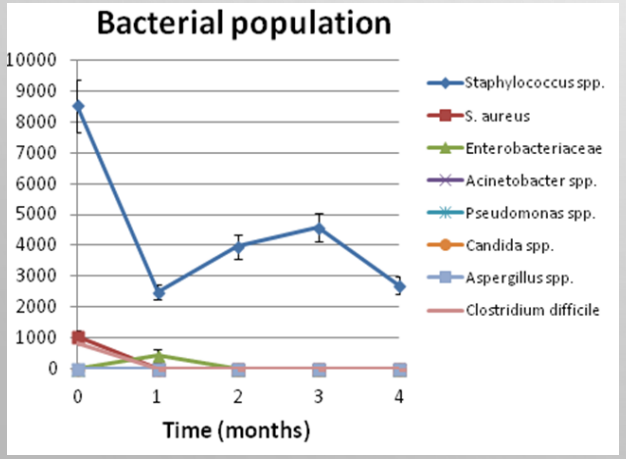
- **RIDUZIONE** di tutti i patogeni HAI-associati analizzati fino a **90%** più che con i disinfettanti tradizionali (cloro).
- Riduzione **STABILE** nel tempo.

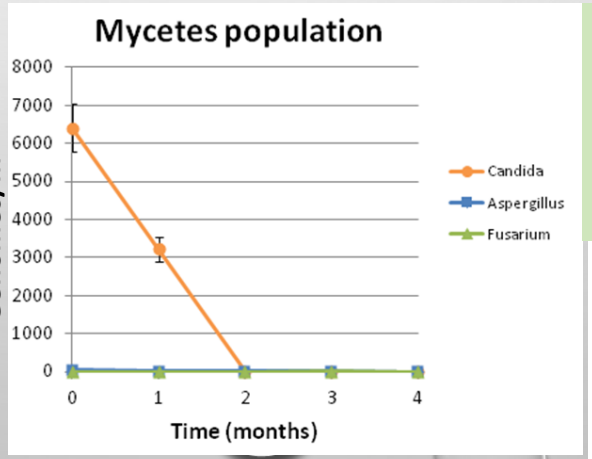

OPEN ACCESS Freely available online PLOS ONE

Hard Surface Biocontrol in Hospitals Using Microbial-Based Cleaning Products

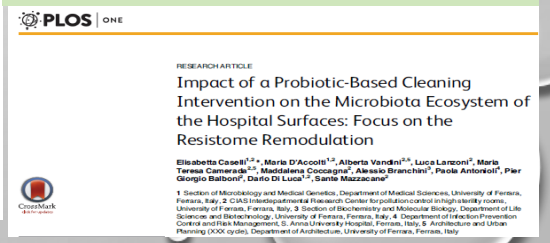
Alberta Vandini[1], Robin Temmerman[2,3], Alessia Frabetti[1], Elisabetta Caselli[4], Paola Antonioli[5], Pier Giorgio Balboni[4], Daniela Platano[6], Alessio Branchini[7], Sante Mazzacane[1]*

1 CIAS Laboratory, Centre for the Study of physical, chemical and microbiological Contamination of Highly Sterile Environments, Department of Architecture, University of Ferrara, Ferrara, Italy, 2 Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Ghent University, Ghent, Belgium, 3 Chrisal R & D Department, Lommel, Belgium, 4 Department of Medical Sciences, Microbiology Section, University of Ferrara, Ferrara, Italy, 5 Department of Infection Prevention Control and Risk Management, Ferrara University Hospital, Ferrara, Italy, 6 Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy, 7 Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy





- **RIDUZIONE** di tutti i patogeni HAI-associati analizzati fino a **99%** rispetto al T=0.
- Riduzione **STABILE** nel tempo.


PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

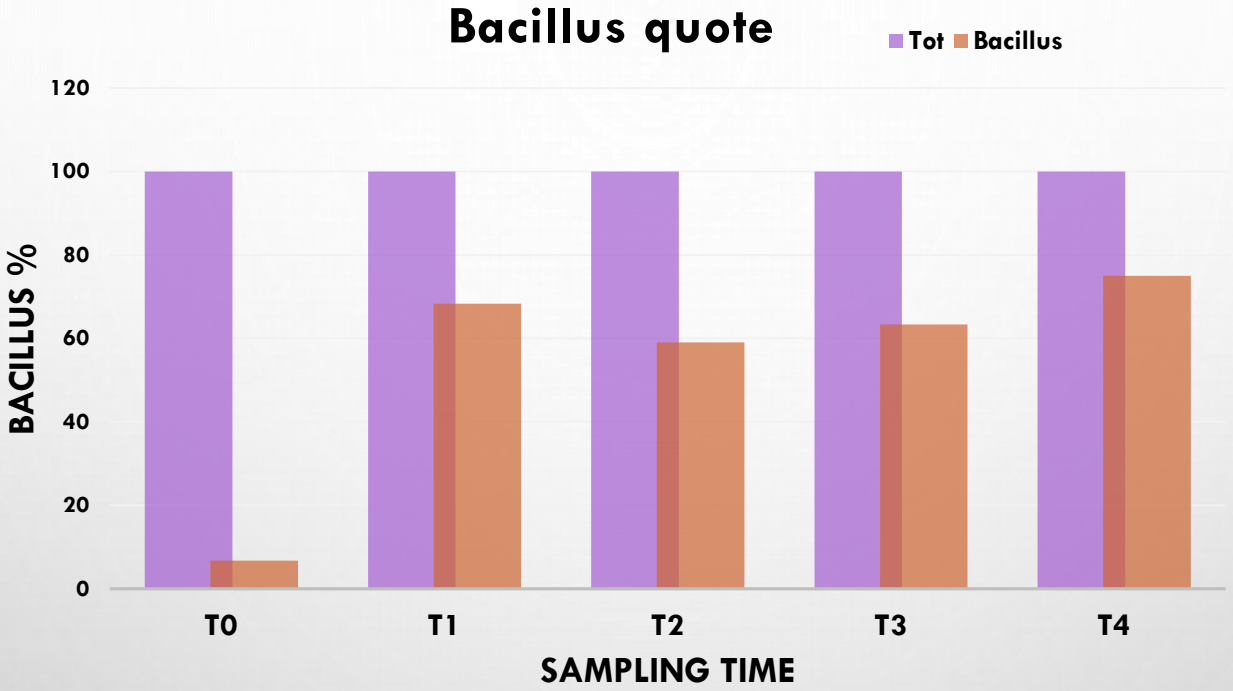
Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation

Elisabetta Caselli[1,2]*, Maria D'Accolti[1,2], Alberta Vandini[2,3], Luca Lanzoni[2], Maria Teresa Camerada[2,3], Maddalena Coccagna[4], Alessio Branchini[5], Paola Antonioli[6], Pier Giorgio Balboni[2], Dario Di Luca[1,2], Sante Mazzacane[2]

1 Section of Microbiology and Medical Genetics, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy, 2 CIAS Interdepartmental Research Center for pollution control in high sterility rooms, University of Ferrara, Ferrara, Italy, 3 Section of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy, 4 Department of Infection Prevention Control and Risk Management, S. Anna University Hospital, Ferrara, Italy, 5 Architecture and Urban Planning (XXX cycle), Department of Architecture, University of Ferrara, Ferrara, Italy

RISULTATI

(Caselli E., et al., PLOS One 2016)



I ceppi di *Bacillus* contenuti nel PCHS
si sostituiscono gradualmente ai patogeni superficiali (75%):
replacement.

Induzione di resistenze?
Analisi farmaco-resistenze nel microbiota residuo

qPCR microarray per geni di RESISTENZA:
84 diversi geni R (sensibilità ~ 10 copie/reazione).

Assay Table

Position	Species (NCBI Tax ID)/Gene	NCBI Tax ID	Antibiotic classification / Gene Description	May detect (species) / Also detect (antibiotic resistance genes) / Associated species (virulence factor genes)	Sensitivity	Assay Catalog #
A01	AAC(6)-Ib-cr		Fluoroquinolone resistance		100	BPAR00366A
A02	aacC1		Aminoglycoside-resistance		50	BPAR00367A
A03	aacC2		Aminoglycoside-resistance		30	BPAR00368A
A04	aacC4		Aminoglycoside-resistance		20	BPAR00369A
A05	aadA1		Aminoglycoside-resistance		200	BPAR00370A
A06	aphA6		Aminoglycoside-resistance		40	BPAR00373A
A07	BES-1		Class A beta-lactamase		20	BPAR00375A
A08	BIC-1		Class A beta-lactamase		100	BPAR00376A
A09	CTX-M-1 Group		Class A beta-lactamase	Detects CTX-M-1 type (37 variants)	50	BPAR00377A
A10	CTX-M-8 Group		Class A beta-lactamase	Detects CTX-M-8 type (3 variants)	40	BPAR00378A
A11	CTX-M-9 Group		Class A beta-lactamase	Detects CTX-M-9 type (40 variants)	30	BPAR00379A
A12	GES		Class A beta-lactamase	GES,IBC	20	BPAR00380A
B01	IMI & NMC-A		Class A beta-lactamase	NMC-A,IMI-2,IMI-3	30	BPAR00381A
B02	KPC		Class A beta-lactamase	KPC-1,KPC-2,KPC-3,KPC-4, KPC-5,KPC-6,KPC-7,KPC-8, KPC-9,KPC-10,KPC-11	40	BPAR00382A
B03	Per-1 group		Class A beta-lactamase	Per-1,Per-3,Per-4,Per-5	30	BPAR00383A
B04	Per-2 group		Class A beta-lactamase	Per-2,Per-6	50	BPAR00384A
B05	SFC-1		Class A beta-lactamase		50	BPAR00385A
B06	SFO-1		Class A beta-lactamase		20	BPAR00386A
B07	SHV		Class A beta-lactamase		200	BPAR00387A
B08	SHV(156D)		Class A beta-lactamase		100	BPAR00388A
B09	SHV(156G)		Class A beta-lactamase		50	BPAR00389A
B10	SHV(238G240E)		Class A beta-lactamase		30	BPAR00390A
B11	SHV(238G240K)		Class A beta-lactamase		40	BPAR00391A
B12	SHV(238S240E)		Class A beta-lactamase		50	BPAR00392A
C01	SHV(238S240K)		Class A beta-lactamase		30	BPAR00393A
C02	SME		Class A beta-lactamase	SME-1,SME-2,SME-3	30	BPAR00394A
C03	TLA-1		Class A beta-lactamase		50	BPAR00395A
C04	VEB		Class A beta-lactamase	VEB-1,VEB-2,VEB-3,VEB-4, VEB-5,VEB-6,VEB-7	20	BPAR00396A
C05	carA		Class B beta-lactamase		30	BPAR00397A
C06	IMP-1 group		Class B beta-lactamase	IMP-1,IMP-3,IMP-4,IMP-6, IMP-10,IMP-25,IMP-26	50	BPAR00398A
C07	IMP-12 group		Class B beta-lactamase	IMP-12,IMP-14,IMP-16, IMP-18	200	BPAR00399A
C08	IMP-2 group		Class B beta-lactamase	IMP-2,IMP-8,IMP-11,IMP-10, IMP-20,IMP-21,IMP-24	30	BPAR00400A
C09	IMP-5 group		Class B beta-lactamase	IMP-5,IMP-7,IMP-9,IMP-13, IMP-15,IMP-22	200	BPAR00401A
			Class B			

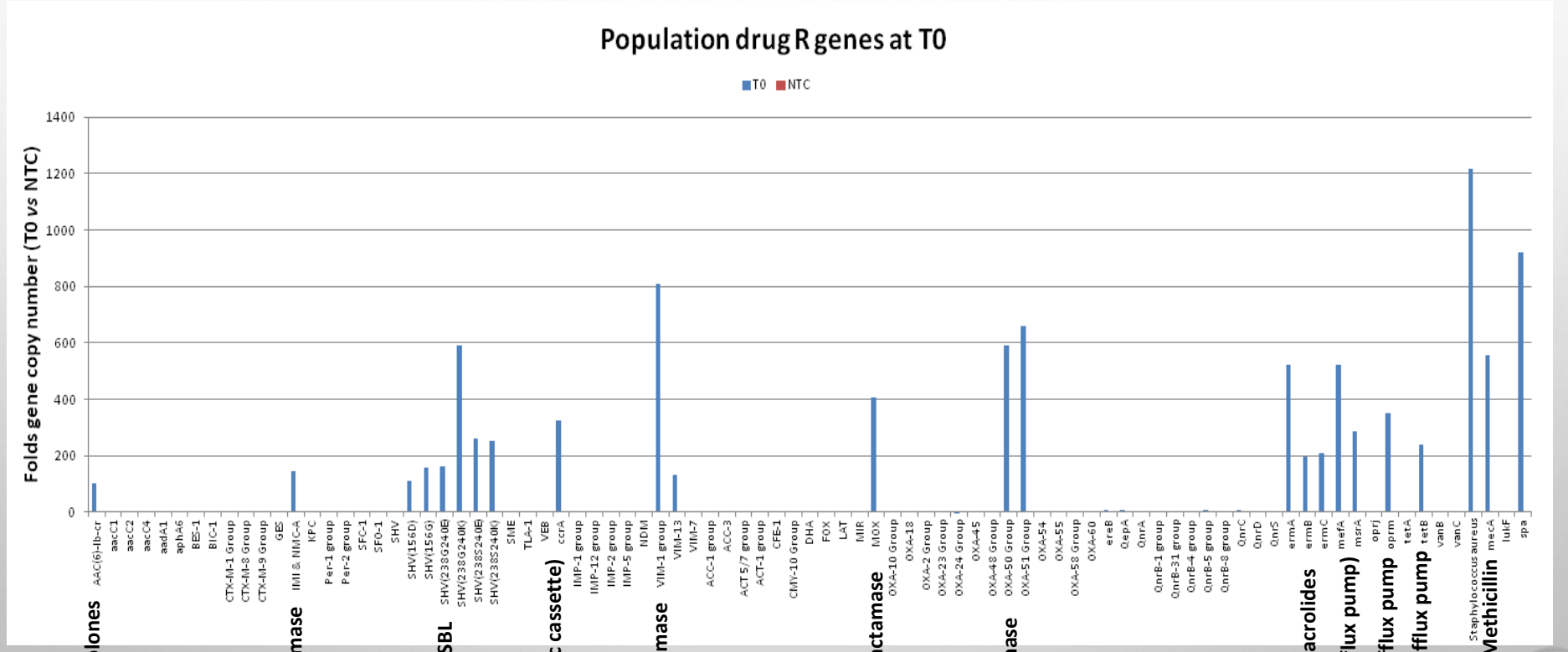
Position	Species (NCBI Tax ID)/Gene	NCBI Tax ID	Antibiotic classification / Gene Description	May detect (species) / Also detect (antibiotic resistance genes) / Associated species (virulence factor genes)	Sensitivity	Assay Catalog #
C10	NDM		beta-lactamase	NDM-1,NDM-2	50	BPAR00402A
C11	VIM-1 group		Class B beta-lactamase	VIM-1,VIM-2,VIM-3,VIM-4, VIM-5,VIM-6,VIM-8,VIM-9, VIM-10,VIM-11,VIM-12, VIM-14,VIM-15,VIM-16, VIM-17,VIM-18,VIM-19, VIM-20,VIM-23,VIM-24, VIM-25,VIM-26	50	BPAR00403A
C12	VIM-13		Class B beta-lactamase	VIM-13 (28 variants)	20	BPAR00404A
D01	VIM-7		Class B beta-lactamase		40	BPAR00405A
D02	ACC-1 group		Class C beta-lactamase	ACC-1,ACC-2,ACC-4	100	BPAR00406A
D03	ACC-3		Class C beta-lactamase		30	BPAR00407A
D04	ACT 5/7 group		Class C beta-lactamase	ACT-5,ACT-7	30	BPAR00408A
D05	ACT-1 group		Class C beta-lactamase	ACT-1,ACT-2,ACT-3,ACT-4, ACT-6	100	BPAR00409A
D06	CFE-1		Class C beta-lactamase		50	BPAR00410A
D07	CMY-10 Group		Class C beta-lactamase	CMY-1,CMY-8,CMY-9, CMY-10,CMY-19	30	BPAR00411A
D08	DHA		Class C beta-lactamase	DHA-1,DHA-2,DHA-3, DHA-5,DHA-6,DHA-7	20	BPAR00412A
D09	FOX		Class C beta-lactamase	FOX-1,FOX-2,FOX-3,FOX-4, FOX-5,FOX-6,FOX-7	100	BPAR00413A
D10	LAT		Class C beta-lactamase	LAT-1,LAT-3,LAT-4,CMY-2 group	100	BPAR00414A
D11	MIR		Class C beta-lactamase	MIR-1,MIR-2,MIR-3,MIR-4, MIR-5	30	BPAR00415A
D12	MOX		Class C beta-lactamase	MOX-1,MOX-2,MOX-3, MOX-4,MOX-5,MOX-6, MOX-7	30	BPAR00416A
E01	OXA-10 Group		Class D beta-lactamase	OXA-10,OXA-11,OXA-14, OXA-16,OXA-17,OXA-19, OXA-28,OXA-35,OXA-142, OXA-145,OXA-147	20	BPAR00417A
E02	OXA-18		Class D beta-lactamase		30	BPAR00418A
E03	OXA-2 Group		Class D beta-lactamase	OXA-2,OXA-15,OXA-32, OXA-34,OXA-141,OXA-161	40	BPAR00419A
E04	OXA-23 Group		Class D beta-lactamase	OXA-23,OXA-27,OXA-49, OXA-73,OXA-133,OXA-146, OXA-165,OXA-166, OXA-167,OXA-168, OXA-169,OXA-170,OXA-171	50	BPAR00420A
E05	OXA-24 Group		Class D beta-lactamase	OXA-24,OXA-25,OXA-26, OXA-40,OXA-72,OXA-139, OXA-160	20	BPAR00421A
E06	OXA-45		Class D beta-lactamase		100	BPAR00422A
E07	OXA-48 Group		Class D beta-lactamase	OXA-48,OXA-162,OXA-163, OXA-181	50	BPAR00423A
E08	OXA-50 Group		Class D beta-lactamase	OXA-50 group (50 variants)	20	BPAR00424A
E09	OXA-51 Group		Class D beta-lactamase	OXA-51 group (65 variants)	100	BPAR00425A
E10	OXA-54		Class D beta-lactamase		20	BPAR00426A
E11	OXA-55		Class D beta-lactamase	OXA-55,OXA-SH1	30	BPAR00427A
E12	OXA-58 Group		Class D beta-lactamase	OXA-58,OXA-96,OXA-97, OXA-164	20	BPAR00428A
F01	OXA-60		Class D beta-lactamase	OXA-60,OXA-60a,OXA-60b, OXA-60c	30	BPAR00429A
F02	ereB		Erythromycin resistance		20	BPAR00431A
			Fluoroquinolone			

Position	Species (NCBI Tax ID)/Gene	NCBI Tax ID	Antibiotic classification / Gene Description	May detect (species) / Also detect (antibiotic resistance genes) / Associated species (virulence factor genes)	Sensitivity	Assay Catalog #
F03	QepA		resistance	QepA1,QepA2	50	BPAR00432A
F04	QnrA		Fluoroquinolone resistance	QnrA1,QnrA2,QnrA3,QnrA4, QnrA5,QnrA6,QnrA7	40	BPAR00433A
F05	QnrB-1 group		Fluoroquinolone resistance	QnrB1,QnrB2,QnrB3,QnrB6, QnrB7,QnrB9,QnrB13, QnrB14,QnrB15,QnrB16, QnrB17,QnrB18,QnrB20, QnrB23,QnrB24,QnrB29, QnrB30	20	BPAR00434A
F06	QnrB-31 group		Fluoroquinolone resistance	QnrB31,QnrB32	20	BPAR00435A
F07	QnrB-4 group		Fluoroquinolone resistance	QnrB4,QnrB11,QnrB12, QnrB22	30	BPAR00436A
F08	QnrB-5 group		Fluoroquinolone resistance	QnrB5,QnrB10,QnrB19	40	BPAR00437A
F09	QnrB-8 group		Fluoroquinolone resistance	QnrB8,QnrB21,QnrB25, QnrB27,QnrB28	20	BPAR00438A
F10	QnrC		Fluoroquinolone resistance		30	BPAR00439A
F11	QnrD		Fluoroquinolone resistance		40	BPAR00440A
F12	QnrS		Fluoroquinolone resistance	QnrS1,QnrS2,QnrS3,QnrS4	40	BPAR00441A
G01	ermA		Macrolide Lincosamide Streptogramin_b		100	BPAR00442A
G02	ermB		Macrolide Lincosamide Streptogramin_b		20	BPAR00443A
G03	ermC		Macrolide Lincosamide Streptogramin_b		100	BPAR00444A
G04	mefA		Macrolide Lincosamide Streptogramin_b		100	BPAR00445A
G05	msrA		Macrolide Lincosamide Streptogramin_b		100	BPAR00446A
G06	oprJ		Multidrug resistance efflux pump		50	BPAR00447A
G07	oprM		Multidrug resistance efflux pump		20	BPAR00448A
G08	tetA		Tetracycline efflux pump		40	BPAR00449A
G09	tetB		Tetracycline efflux pump		30	BPAR00450A
G10	vanB		Vancomycin resistance		100	BPAR00451A
G11	vanC		Vancomycin resistance		30	BPAR00452A
G12	Staphylococcus aureus	1280		Staphylococcus epidermidis(1282)	100	BPID00314A
H01	mecA		Beta-lactam resistance		40	BPAR00374A
H02	lukF		Panton-Valentine leukocidin chain F precursor	Staphylococcus aureus	20	BPVP00517A
H03	spa		Immunoglobulin G binding protein A precursor	Staphylococcus aureus	200	BPVP00518A
H04	Pan Bacteria 1					BPCL00360A
H05	Pan Bacteria 1					BPCL00360A
H06	Pan Bacteria 1					BPCL00360A
H07	Pan Bacteria 3					BPCL00362A
H08	Pan Bacteria 3					BPCL00362A
H09	Pan Bacteria 3					BPCL00362A
H10	PPC					BPCL00365A
H11	PPC					BPCL00365A
H12	PPC					BPCL00365A

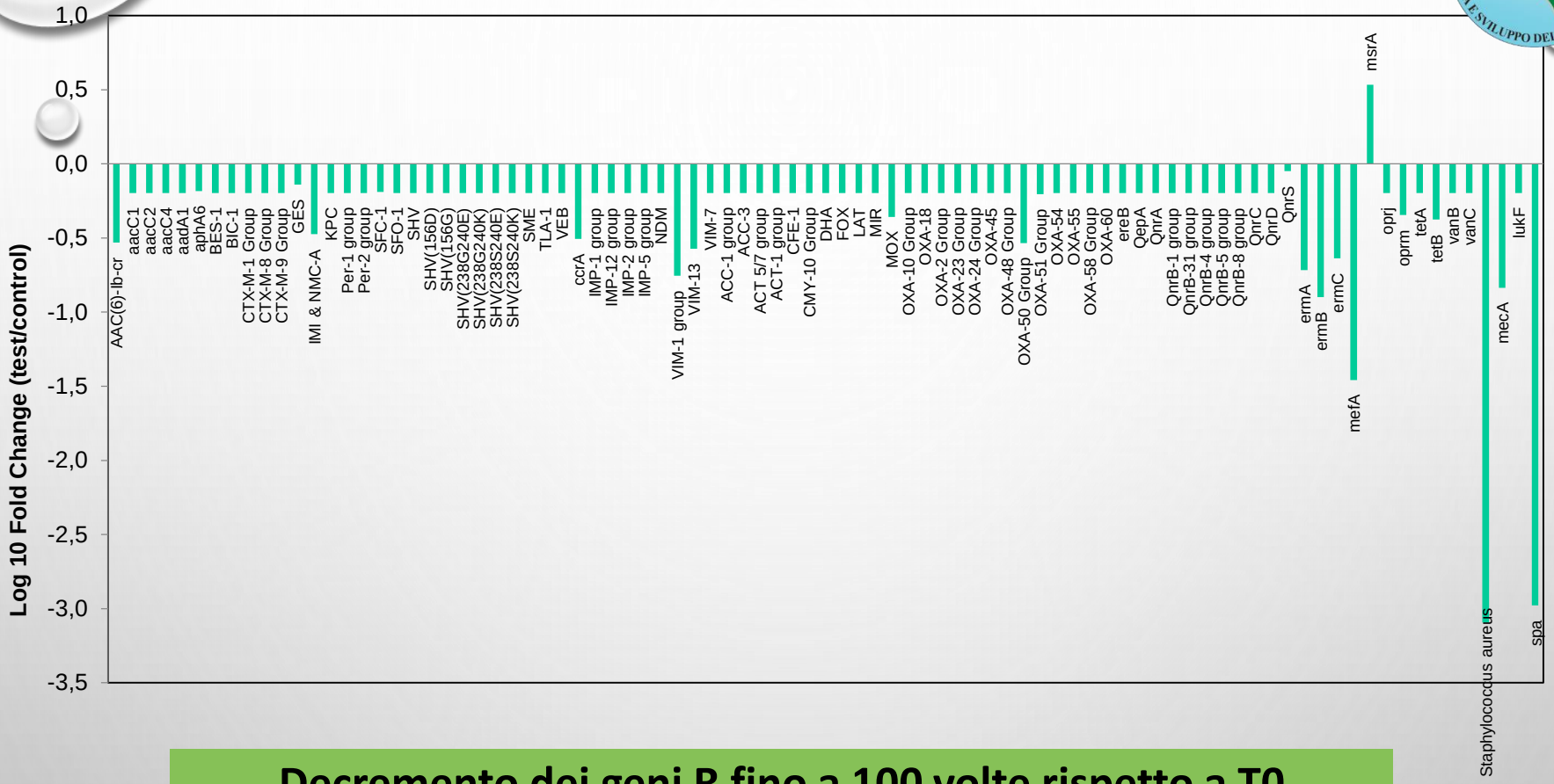
Antibiotico resistenze trovate nel microbiota superficiale a T0

(Caselli E., et al., PLOS One 2016)

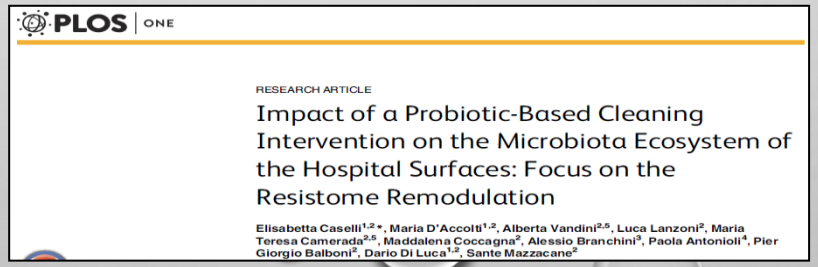
T0: trovate resistenze ad almeno **12 classi** di antibiotici.



T1: Geni di resistenza evidenziati
(1 mese dopo l'applicazione del PCHS)



Decremento dei geni R fino a 100 volte rispetto a T0

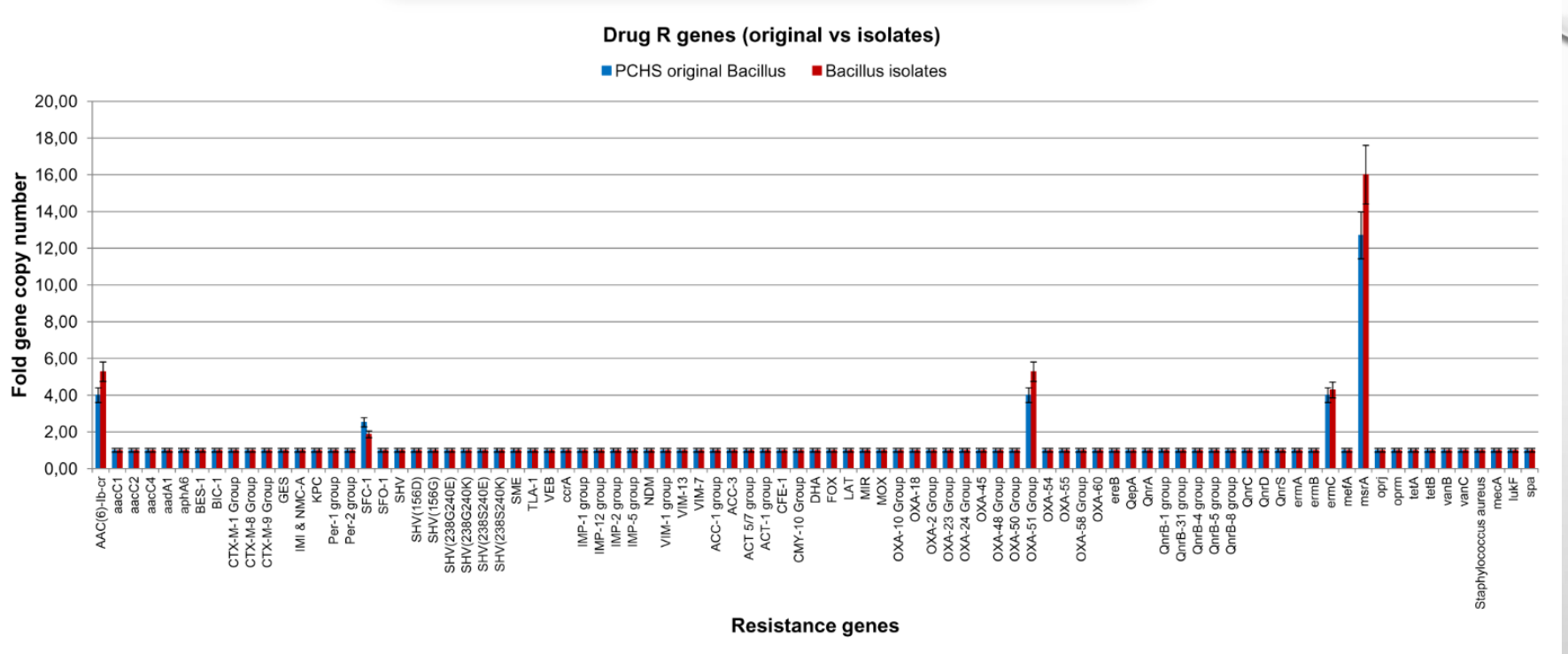

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation

Elisabetta Caselli[1,2]*, Maria D'Accolti[1,2], Alberta Vandini[2,5], Luca Lanzoni[2], Maria Teresa Camerada[2,5], Maddalena Coccagna[2], Alessio Branchini[3], Paola Antonioli[4], Pier Giorgio Balboni[2], Dario Di Luca[1,2], Sante Mazzacane[2]

SICUREZZA D'USO



Le stesse analisi (resistoma) applicate anche ai *Bacillus* isolati dalle superfici trattate (fino a 4 anni):
nessuna acquisizione di resistenze rispetto ai ceppi originali

Stabilità genetica

SICUREZZA D'USO

1. Implementazione sorveglianza microbiologica per *Bacillus*

Ricerca di *Bacillus* in tutti i campioni clinici dei pazienti ospedalizzati in 7 strutture trattate con PCHS (in **4 anni**).

Oltre **32.000** campioni analizzati:

nessun campione positivo per *Bacillus*.





Journal of Hospital Infection 94 (2016) 193–208

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Hospital Infection

journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/jhin

ELSEVIER

Letters to the Editor

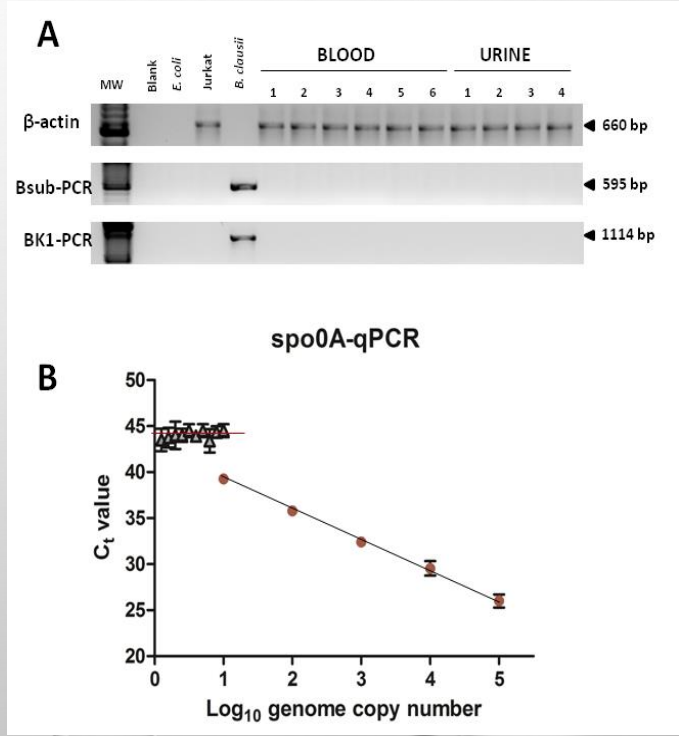
Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation

E. Caselli[a,b,*] P. Antonioli[c] S. Mazzacane[b]

2. Analisi molecolare di pazienti con HAI

Sangue e **urine** di 6 pazienti, analizzati con 3 metodi diversi: **2 PCR** (sensibilità 100 copie) e **qPCR** (sensibilità 10 copie):

nessun campione positivo per *Bacillus*.



CONCLUSIONI

1. Il PCHS induce l'**abbattimeno stabile** dei patogeni superficiali (i *Bacillus* rimpiazzano i patogeni sulle superfici)

2. Il PCHS **non induce selezione di specie resistenti**, ma anzi **riduce la popolazione resistente** (fino a 100 volte meno geni R rispetto a pre-PCHS)

3. I *Bacillus* del PCHS **non causano infezioni** nei pazienti ospedalizzati (analisi fino a 4 anni).

4. Le **analisi molecolari** sono importanti strumenti per monitorare la popolazione microbica ambientale e da paziente.

5. Ulteriore studio pre-post, multicentrico, 18 mesi, ultimato 30/06/2017, per verificare se la riduzione di contaminazione superficiale corrisponde ad una **riduzione del numero di HAI** (7 ospedali italiani). Trial registration n. ISRCTN58986947

ISRCTN registry

BioMed Central
The Open Access Publisher


Journal of Clinical Trials

Caselli, et al., J Clin Trials 2016, 6:5
DOI: 10.4172/2167-0870.1000285

Protocol — OMICS International

Influence of Sanitizing Methods on Healthcare-Associated Infections Onset: A Multicentre, Randomized, Controlled Pre-Post Interventional Study

Caselli E[1,2*], Berloco F[3], Tognon L[4], Villone G[5], La Fauci V[6], Nola S[7], Antonioli P[7], Coccagna M[2], Balboni PG[2], Pelissero G[8], Tarricone R[9], Trua N[10], Brusaferro S[11], Mazzacane S[2] and Study Group SAN-ICA[1-11]

RINGRAZIAMENTI

Section of Microbiology (University of Ferrara):
Dr. M. D'Accolti
Dr. M. Piffanelli
Dr. Irene Soffritti

CIAS Laboratories (Interdepartment Research Center, University of Ferrara):
Prof. S. Mazzacane
Dr. M. Coccagna
Tekne Hub Staff

S. Anna University-Hospital (Ferrara):
Dr. P. Antonioli

