

# Il sistema di sanificazione PCHS Probiotic Cleaning Hygien System: risultati delle indagini sperimentali in vitro ed in campo

## Riassunto

Lo scopo principale delle procedure di sanificazione è inerente alla riduzione/eliminazione dei microrganismi presenti sulle superfici degli ambienti ospedalieri. Poiché è noto che i potenziali patogeni possono sviluppare resistenze sia agli antibiotici che ai disinfettanti chimici usati nelle comuni pratiche di pulizia, sono stati condotti studi sperimentali all'interno di strutture ospedaliere, con il fine di verificare l'efficacia di innovativi prodotti sanificanti a base di probiotici. Tali prodotti vengono utilizzati nell'ambito di un sistema integrato di gestione delle pratiche di sanificazione denominato PCHS. Nel lavoro vengono esposti i risultati ottenuti con questo protocollo di pulizia e vengono confrontati con gli analoghi risultati ottenibili mediante l'impiego di prodotti disinfettanti tradizionali.

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

\* CIAS, Centro studi Inquinamento Ambienti elevata Sterilità, Centro di ricerca interdipartimentale Dipartimento di Architettura e Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara

\*\* Azienda Ospedaliero Universitaria di Ferrara, Struttura Dipartimentale di Igiene Ospedaliera e Qualità dei Servizi Ambientali, Ferrara

\*\*\* Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università di Ferrara

\*\*\*\* Dipartimento di Biomedicina e Scienze motorie, Università di Bologna

## PAROLE CHIAVE:

Contaminazione, disinfettanti chimici, probiotici, sanificazione, degenze ospedaliere

## INTRODUZIONE

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

Le infezioni nosocomiali (ICA) sono una delle complicanze più frequenti che possono verificarsi in strutture sanitarie. Il 5% -15% di tutti i pazienti ricoverati in ospeda-

le possono sviluppare almeno una ICA durante il ricovero [1].

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

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

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

Recenti ricerche sperimentali hanno individuato la possibilità di utilizzare nuove metodologie di sanificazione, che sfruttano il "principio della competizione biologica", utilizzando prodotti probiotici (PIP) - costituiti da *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus pumilus* sotto forma vegetativa e sporigena - con carica microbica non patogena, in grado di colonizzare le superfici su cui vengono applicati, contrastando la proliferazione delle altre specie batteriche in base al principio della esclusione competitiva.

Tale principio (legge di Gause, 1934) consiste nel fatto che due diverse specie (batteriche e/o fungine), che insistono sullo stesso microcosmo ecologico, non possono coesistere in equilibrio stabile se fanno riferimento agli stessi substrati nutritivi, ma una delle due, normalmente la meno esigente per fattori nutrizionali, diventerà predominante rispetto all'altra, potendone causare anche l'estinzione.

Di fatto, la crescita di un microrganismo può essere rappresentata dalla curva esposta nella Figura 1, ovvero da una “funzione sigmoideale” (P. F. Verhulst, 1838), con forma ad S.

Nei primi minuti la crescita del microrganismo è di tipo esponenziale. Successivamente, a causa della pressione ambientale (termine generico che indica l'insieme di tutti gli elementi avversi che ostacolano lo sviluppo di un microrganismo), il tasso di crescita prima si attenua e poi, passando attraverso un punto di flesso, raggiunge un asintoto, il cui valore dipende dalle variabili nutrizionali dell'ambiente stesso e dei fattori esterni che generano competizione con altre specie.

È da notare che il modello di Verhulst (1838) è stato utilizzato per la stima della crescita della popolazione mondiale e quindi rappresentava di fatto un modello teorico (demografico logistico). Gli esperimenti di Gause (Figura 2, 3 e 4), condotti in laboratorio con diversi microrganismi, hanno validato sperimentalmente tale ipotesi, grazie alla quale è stato enunciato il principio della competizione esclusiva.

La metodologia di pulizia e sanificazione basata sull'impiego di prodotti probiotici sfrutta di fatto la legge di Gause e il fenomeno della esclusione competitiva.

Dopo la loro diffusione sulle superfici durante l'operazione di pulizia, questi microrganismi sono in grado di germinare e quindi di esercitare l'azione competitiva nei confronti dei ceppi potenzialmente patogeni, di fatto diminuendo il valore dell'asintoto rappresentato dalla linea rossa di Figura 1.

Il risultato della riduzione delle altre specie microbiche non è temporaneo, come quello ottenuto dai disinfettanti chimici, ma duraturo nel tempo, in quanto il ciclo di sporulazione è pressoché continuo, in relazione alle condizioni

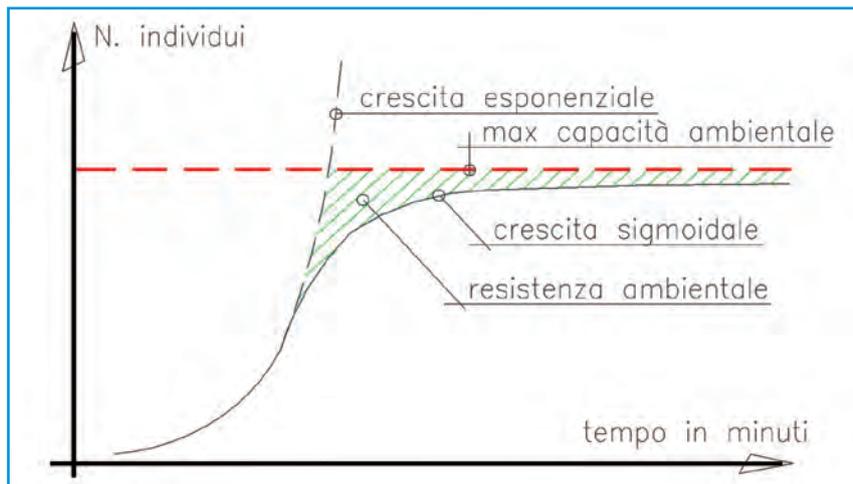


Figura 1 - Modello di Verhulst ripreso da Lokta - Volterra, Pearl e Gause.

ambientali tipiche di un ambiente antropico.

Queste procedure possono essere definite “tecniche di biostabilizzazione” di una specie rispetto ad un'altra, non implicando pertanto un'azione biocida generalizzata, se

non come effetto finale nei confronti di determinate specie microbiche.

La concentrazione nei prodotti probiotici di spore di una miscela di *Bacillus spp.*, pari a 106 unità/ml, è in grado di favorire in breve tempo

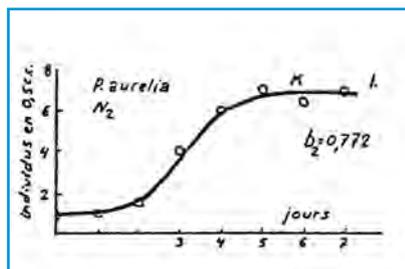


Figura 2 - Esperimenti di laboratorio di Gause con il *Paramecium aurelia*

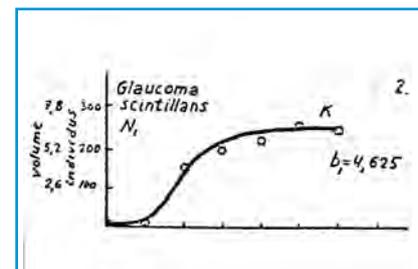


Figura 3 - Esperimenti di laboratorio di Gause con il *Glaucoma scintillans*

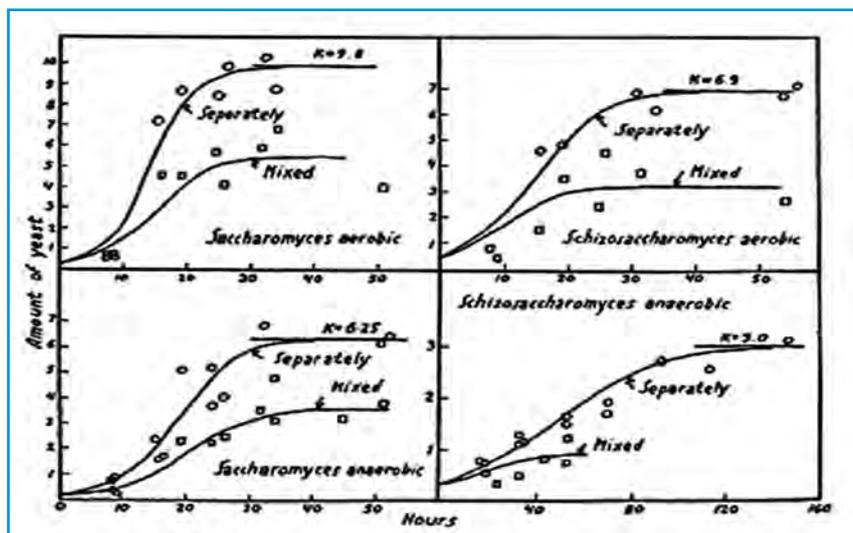


Figura 4 - Esperimenti di laboratorio di Gause. Crescita del *Saccharomyces cerevisia* e dello *Schizosaccharomyces kephir* in condizioni aerobiche e anaerobiche

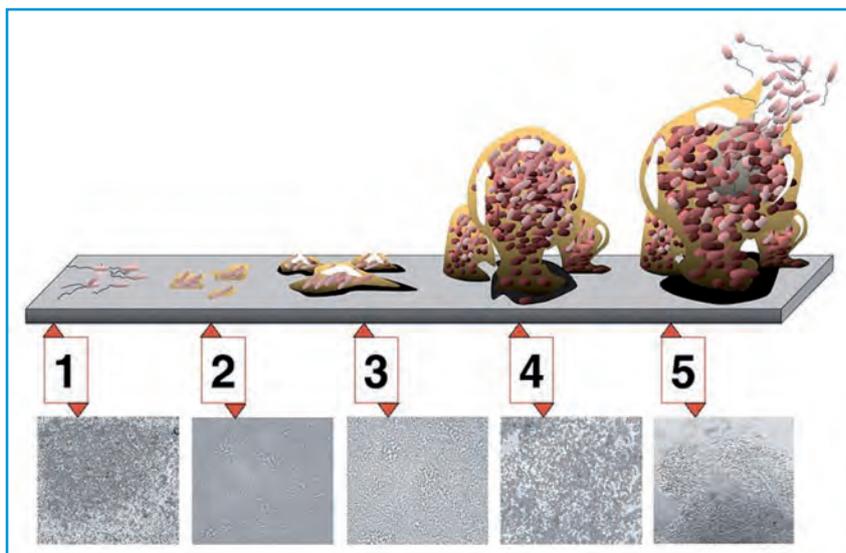


Figura 5 - Stadi di evoluzione del Biofilm. Questo schema illustra i 5 stadi di evoluzione del Biofilm: attacco iniziale, ancoraggio irreversibile, prima maturazione, seconda maturazione e dispersione finale. Sotto lo schema vengono mostrate al microscopio elettronico le rispettive 5 fasi rappresentative di ogni steps. Immagine di D. Davis form Monroe, D "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms" PLoS Biol, Vol 5, issue 11.

l'azione competitiva nei confronti di tutti gli altri microrganismi, indistintamente Gram positivi, Gram negativi, miceti e altri bacilli sporigeni (ad esempio *Clostridium spp.*), come dimostrato dalle sperimentazioni "su campo" effettuate nel 2006 nell'ospedale di Lokeren, in collaborazione con l'Università di Ghent (Belgio) e nel 2011 all'Arcispedale S. Anna (FE - Italia).

In generale i batteri, soprattutto i potenziali patogeni, hanno una forte tendenza a sviluppare resistenza a qualsiasi sostanza che possa pregiudicarne lo sviluppo o essere letale per loro. Questo fenomeno è attualmente in crescente aumento nei confronti degli antibiotici e dei disinfettanti conosciuti.

Una normale procedura di disinfezione lascia sulle superfici trattate sufficiente materia organica, carboidrati e proteine in grado di sostenere una veloce ricolonizzazione. I disinfettanti fino ad oggi utilizzati sono caratterizzati da un evidente svantaggio, in quanto non esercitano una mirata azione biocida, venendo eliminati tutti i tipi di

microrganismi, indipendentemente dalla loro potenziale patogenicità o meno.

Si ottiene tuttavia in questo modo una "superficie libera", con sufficiente materia organica, carboidrati e proteine, che può essere utilizzata anche da un solo potenziale patogeno per avviare una veloce ricolonizzazione in un periodo di tempo molto limitato (un solo potenziale patogeno è in grado di moltiplicarsi per dare vita ad una popolazione di un milione di cellule entro 8 ore [5,6,7].

Pertanto la disinfezione chimica tradizionale dà come risultato una rapida riduzione del numero di microrganismi, ma con un effetto molto breve e instabile [8,9].

A causa dei problemi attuali di resistenza, sarebbe necessario il continuo aumento delle concentrazioni e della frequenza di applicazione dei disinfettanti, che sono dannosi per l'uomo e l'ambiente, a causa della loro natura chimica aggressiva. Anche la disinfezione crociata che nell'immediato è efficace nel contenimento delle resistenze, nel

tempo porta comunque allo sviluppo di queste.

Il meccanismo di azione dei probiotici è completamente diverso; una volta diffusi sulle superficie mediante le procedure di pulizia, diventano attivi, consumano le fonti nutritive ed invadono lo spazio contrastando efficacemente i potenziali patogeni ed entrando in competizione con i medesimi.

Tuttavia, in ambienti molto contaminati l'esclusione competitiva non è sufficiente a indurre un rapido effetto biostabilizzante, perché deve combinarsi con il *quorum sensing*, ossia la comunicazione tra i microrganismi, soprattutto tra i potenziali patogeni [10,11].

Il *quorum sensing* (QS) è relativo alla capacità dei microrganismi di comunicare e di coordinare il comportamento utilizzando molecole chimiche di segnalazione. Queste molecole sono chiamate autoinducers, e sono di due tipologie: peptidi o omoserina lattone acilato (AHL).

Solitamente tramite il *quorum sensing* i microrganismi comunicano tra loro e, se le condizioni per la loro crescita non sono ottimali (temperatura, grado di umidità, fonti nutritive, ecc.), si informano reciprocamente di tali condizioni ambientali sfavorevoli e si proteggono riducendo o modificando il metabolismo.

Questo fenomeno è alla base, ad esempio, della formazione del *biofilm* (Figura 5), costituito da un aggregato complesso altamente stratificato di microrganismi e caratterizzato dalla secrezione di una matrice adesiva e protettiva, adesa ad una superficie, in cui i microrganismi sono organizzati in una comunità funzionale.

Il *biofilm* è serbatoio di microrganismi, dal quale si possono scatenare processi che incentivano, direttamente o indirettamente l'insorgenza di infezioni. All'interno del *biofilm* solitamente i microrganismi

presentano due distinte modalità di comportamento;

la prima è la forma fluttuante, o planctonica, nella quale le cellule separate fluttuano o nuotano indipendentemente in un supporto liquido,

la seconda è lo stato aggregato, o sessile, in cui le cellule sono strettamente vincolate e fermamente attaccate l'una all'altra ed anche, di solito, ad una superficie solida [12,13].

La modifica del comportamento è attivata da un meccanismo di comunicazione chimica (mediante la produzione di *autoinducers* o autoinduttori) che differisce tra le specie microbiche.

Alcune specie possono produrre molecole AHL (*Acylated Homoserine Lactones*), come segnale di "quiescenza", che induce le cellule planctoniche circostanti al cambiamento fenotipico verso lo stato sessile, attraverso una differente espressione dei geni della cellula. I biofilm sono un problema enorme sia in campo medico che industriale. È stato stimato che il 65% delle infezioni nosocomiali da *Clostridium difficile* sono causate dalla presenza di *biofilm* [11,12,14].

Il QS (o rilevazione del quorum) rappresenta anche il sistema di segnalazione che i batteri di una stessa specie usano per comunicare tra di loro e controllare reciprocamente l'espressione genica una volta che la densità della popolazione diventa sufficientemente elevata.

Quasi tutti i batteri, compresi i batteri patogeni, come *Pseudomonas aeruginosa*, comunicano tra di loro per mezzo del QS in funzione della densità di popolazione (Figura 6). La cellula batterica produce una molecola segnale specifica (in genere AHL), che diffonde nello spazio extracellulare ed entra nel citoplasma dei microrganismi adiacenti della stessa specie.

Quando la molecola segnale supera una certa soglia di concentra-

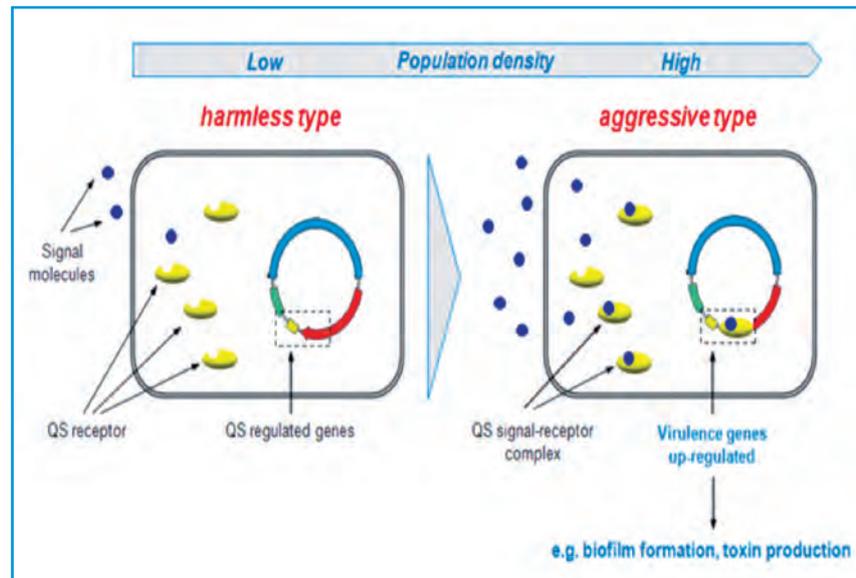


Figura 6 - quorum sensing (QS)

zione, all'interno delle cellule di una popolazione batterica si va a legare ad una proteina regolatrice, determinando l'attivazione o la repressione di una serie di geni, e indirizzando quindi il decorso di vie metaboliche e di interi processi cellulari importanti, come la crescita, la virulenza, la motilità e la formazione di *biofilm* [15,16]. Il *Bacillus subtilis* utilizza il QS per regolare due diversi processi biologici: la competenza e la sporulazione.

Il processo di competenza si ha quando i batteri *B. subtilis* sono ad alta densità cellulare e circa il 10% delle cellule batteriche sono indotte a diventare competenti *chromosomes* [38][39].

Si forma quindi una sottopopolazione che produce degli *autoinducers*, i peptidi ComX (definiti fattori competenza), che vengono secreti e si accumulano in funzione della densità cellulare [17,12,13]. Una volta che viene raggiunto il livello di soglia extracellulare, l'*autoinducer* ComX è rilevato e si lega alla corrispondente proteina regolatrice, determinando così l'attivazione dell'espressione di un certo numero di geni necessari per competenza [18].

Il processo di sporulazione, invece, è una risposta fisiologica del *B. subtilis* all'esaurimento delle sostanze nutritive all'interno di un ambiente particolare e viene da segnali extracellulari.

Quando la popolazione di *B. subtilis* percepisce condizioni sfavorevoli, risponde in fase di divisione cellulare asimmetrica, per produrre le spore.

La sporulazione è mediata da un fattore di sporulazione (CSF, che è un pentapeptide). Il CSF viene secreto nell'ambiente extracellulare e trasportato intracellularmente [19]: basse concentrazioni interne di CSF contribuiscono alla competenza, mentre alte concentrazioni inducono la sporulazione [20].

Per questo motivo i *Bacillus spp.* possono trovarsi sulla stessa superficie contemporaneamente sia in forma vegetativa che come spora, dimostrandosi maggiormente vitali, e riuscendo a regolare il processo di competenza e di sporulazione. Inoltre da *Bacillus spp.* isolati dal suolo è stato scoperto un gene (aiiA240B1), che codifica un enzima in grado di inattivare gli AHL degradando il legame lattonico.

La miscela di *Bacillus spp.* del sistema PCHS, essendo formata da

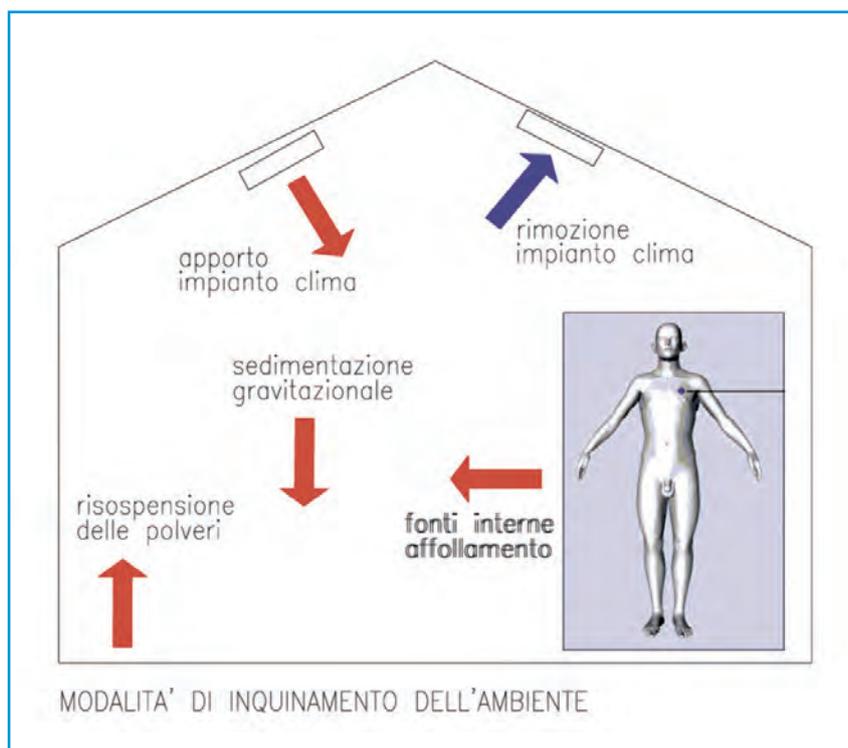


Figura 7 - Schematizzazione dei processi di inquinamento di un ambiente

*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*, è in grado di inibire il QS dei survivors (o potenziali patogeni), contrastandone la formazione di *biofilm* e provocandone la scomparsa per competizione.

## MODALITÀ DI INQUINAMENTO DEGLI AMBIENTI OSPEDALIERI

In generale, ogni ambiente abitato è caratterizzato dalla presenza di inquinanti di tipo chimico, fisico e microbiologico.

Tralasciando per il momento la contaminazione di tipo chimico, per lo più legata al rilascio di particolari sostanze volatili (VOC – *volatile organic compounds*) dagli arredi o all'aria esterna (ossidi di azoto e zolfo, CO e CO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>), le modalità di inquinamento di un ambiente da parte delle polveri e dei microrganismi sono molteplici (Figura 7) e imputabili in sintesi:

- al tasso di produzione e di rimozione di contaminanti particellari e microbici mediante i processi di

ventilazione naturale o meccanica (sistemi di climatizzazione),

- all'apporto degli individui, siano essi operatori sanitari interni alla struttura, che visitatori esterni, che, toccando le superfici, contribuiscono al deposito sulle medesime di agenti microbici di diverso genere ed al successivo trasporto, sempre per contatto sequenziale, della carica microbica su altre superfici prossime al letto di degenza;

- ai fenomeni di sedimentazione gravitazionale delle polveri aerosospese, sulla cui superficie possono trovarsi microrganismi adesi, la cui intensità dipende dalle dimensioni e dal peso specifico delle medesime;

- ai processi di risospensione del particolato, causato dai fenomeni termici (forze di galleggiamento di Archimede) e cinetici (velocità dell'aria), imputabili sia alle correnti di aria causate dagli impianti di climatizzazione, sia alle fonti interne, apparecchiature dotate di ventilatori o fonti di calore, che esterne (ad es. irraggiamento solare) all'ambiente considerato.

Se da un lato l'apporto di inquinanti imputabile agli impianti di ventilazione è controllabile con la corretta manutenzione dei sistemi filtranti delle apparecchiature aeruliche, non altrettanto si può dire dell'apporto di polveri e microrganismi all'ambiente da parte degli individui presenti.

Si stima infatti che l'emissione media di particolato di varie dimensioni da parte di questi ultimi sia compresa tra 100.000 e 1.000.000 di particelle al minuto, in funzione della attività svolta e del vestiario. Circa il 10 % delle polveri può trasportare carica microbica, contribuendo quindi alla diffusione per via aerea dei microrganismi.

Un ulteriore aspetto, in genere non adeguatamente considerato nelle procedure ospedaliere (tranne in reparti ad altissima sterilità), è l'abitudine ad acconsentire che gli utenti possano raccogliere e tenere vicino a sé i propri effetti personali, all'interno delle stanze di degenza. Questa prassi, soprattutto ove siano presenti più pazienti nello stesso ambiente e non sia possibile inserire una dotazione idonea di armadiature richiudibili ed individuali, causa l'accumularsi di oggetti che provengono dall'esterno e che non possono essere sanificati. Il fenomeno è ancora più pericoloso ove si consenta di detenere anche alimenti portati dall'esterno, il cui deteriorarsi è fonte di ulteriori rischi potenziali.

Queste fonti di infezione sono incrementate dall'impossibilità per gli addetti di rimuovere gli oggetti accumulati, soprattutto quando pressati dalla necessità di attenersi a tempi prefissati per la pulizia delle stanze. La difficoltà di agire manualmente per la sanificazione (e quindi la parallela necessità di aumentare campionature di controllo in fase di indagine) si ha anche in corrispondenza di alcune strumentazioni considerate "sensibili" (come le pulsantiere e le consolle

<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	Cute e vie aeree superiori
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	Lume intestinale, ambienti con contaminazione fecale sia umana che animale
<i>Pseudomonas spp.</i>	Gram -	Ambientale, ampia resistenza agli antibiotici (trasmissibile ad altra specie)
<i>Candida albicans</i>		Ambientale, mucose della bocca, del lume intestinale, dei genitali
<i>Clostridium difficile</i>	Gram +	Anaerobio obbligato, ambientale, lume intestinale (3% portatori sani)
<i>Acinetobacter</i>	Gram -	Ambientale, ampia resistenza agli antibiotici (trasmissibile ad altre specie)
<i>Klebsiella spp.</i>	Gram -	Ambientale, mucosa respiratoria e intestino

Tabella 1 - Caratteristiche generali dei più importanti microrganismi nosocomiali potenzialmente patogeni

di comando elettroniche) oppure, più banalmente, sulle superfici inferiori di alcuni accessori di arredo, ad esempio i tavolini di servizio (disponibili come accessorio per la somministrazione dei pasti in molti tipi di letto) [21].

La possibilità per il paziente di avere uno spazio di cura caratterizzato da elementi rassicuranti, la cui tipologia e colore richiamino l'ambito residenziale e non quello tipicamente ospedaliero, è ormai universalmente considerato un aspetto strategico per ridurre lo stress psicologico dovuto alla degenza. Questa personalizzazione non dovrebbe però avvenire con accessori di proprietà del paziente (come di fatto accade in molti spazi di cura) bensì attraverso scelte preliminari di finiture, arredi e dotazioni interne alle stanze, tutti elementi che potranno poi essere controllati e sanificati secondo le procedure previste dalla struttura ospedaliera. Ogni eventuale diversa concessione andrebbe quindi attentamente valutata e controllata, così come avviene per l'accesso di individui dall'esterno.

## INQUADRAMENTO DELLE RICERCHE

La recente disponibilità di prodotti probiotici, a base di *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus*

*megaterium*, destinati alla sanificazione/igienizzazione delle superfici ed al controllo della carica microbica residente, ha suggerito la conduzione di una ricerca sperimentale, finalizzata alla verifica quali quantitativa, sia "in vitro" che "in campo", della loro efficacia rispetto all'impiego di trattamenti tradizionali a base di disinfettanti chimici.

Un primo obiettivo era quindi rappresentato dalla valutazione della efficacia di abbattimento della carica potenzialmente patogena, rilevata sulle superfici di ambienti nosocomiali trattate con prodotti probiotici (PIP Probiotics In Progress) del Sistema PCHS, rispetto al caso di impiego di prodotti tradizionali chimici.

Un secondo obiettivo consisteva, poi, nella valutazione delle ricadute del nuovo protocollo di sanificazione a base di probiotici PCHS sugli eventi infettivi ospedalieri in relazione alle mutate condizioni di inquinamento microbiologico.

I microrganismi oggetto di indagine sono stati quelli ritenuti più interessanti sotto il profilo delle infezioni ospedaliere (Tabella 1): *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas spp.*, coliformi (compreso *Escherichia coli*), *Candida albicans* e *Acinetobacter spp.*

Per incrementare i dati della ricerca ed avere maggiore oggettività

statistica dei valori in campo sono attualmente corso ulteriori indagini sperimentali per ciò che attiene al *Clostridium difficile*, ad *Acinetobacter* e *Klebsiella spp.* Lo studio è stato condotto sia con prove *in vitro* che con prove *in campo* presso diverse strutture ospedaliere.

## PROVE IN VITRO

Lo scopo delle prove *in vitro* (UNI ISO 13697:2001) consisteva nel verificare l'efficacia dell'azione competitiva dei prodotti probiotici (PIP) rispetto ad altre specie batteriche in condizioni controllate, cioè assenza di elementi esterni di disturbo (in laboratorio), ovvero di quei processi di ricontaminazione delle superfici trattate, che avvengono naturalmente negli ambienti ad occupazione umana.

Allo scopo sono stati testati tre diversi prodotti probiotici, di cui uno per la pulizia dei servizi igienici, uno per i pavimenti ed uno per gli arredi.

La soluzione detergente a base di probiotici conteneva l'1% di spore (corrispondenti a una concentrazione di 30 X 10<sup>6</sup> Unità Formanti Colonia (UFC)/ml) di batteri (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*), addizionata di molecole detergenti, surfactanti quali ionico (0.6%), anionici (0.8%) ed enzimi (0.02%). È stato utilizza-

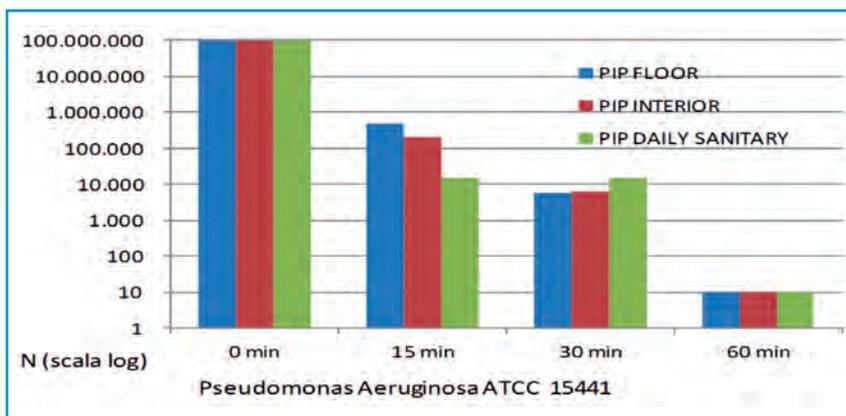


Figura 8 - Riduzione in vitro della carica di *Pseudomonas aeruginosa*

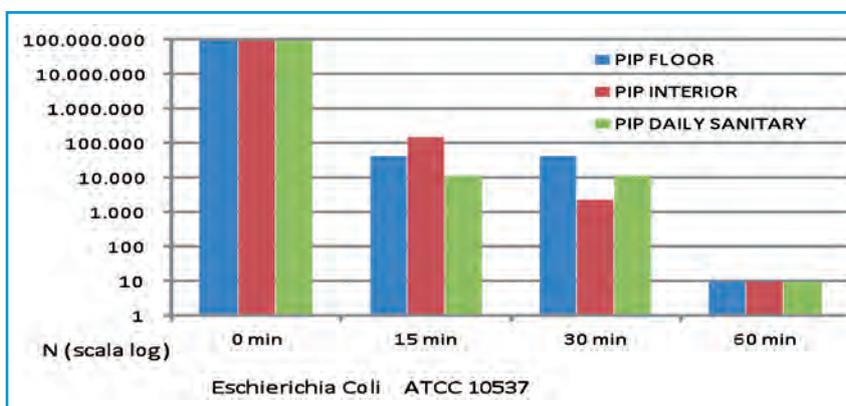


Figura 9 - Riduzione in vitro della carica di *Escherichia coli*

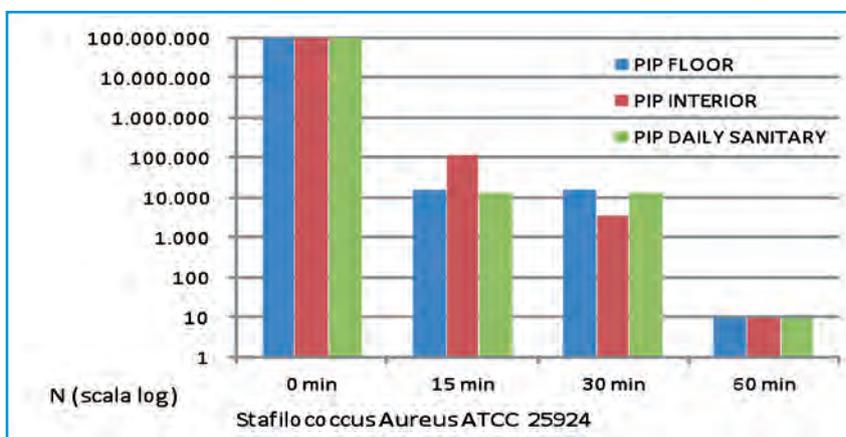


Figura 10 - Riduzione in vitro della carica di *Staphylococcus aureus*

to un controllo positivo comprendente un disinfettante chimico di provata efficacia antibatterica: una soluzione chimica contenente 0.65% di ipoclorito di sodio e 0.02% di surfactante.

Per la prova "in vitro" sono stati scelti come microrganismi test dei ceppi microbici standard ATCC (*American Type Culture Collection*):

*Escherichia coli* (ATCC 10536, Chrisscope Technologies, Lake Charles, LA, USA), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Chrisscope Technologies) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027, PBI International, Milan, Italy) sono state coltivate su terreni di coltura selettivi e/o differenziativi, quali rispettivamente MacConkey Agar (Merck Millipore,

Darmstadt, Germany), Baird-Parker Agar (Merck Millipore) e Cetrimide Agar (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Il Tryptic Soy Contact Agar (TSA, Merck Millipore) è stato impiegato per la conta totale dei microrganismi (TMC).

La crescita di tutte le specie batteriche è stata ottenuta mediante incubazione a 37°C per 18-24 ore, seguite poi da 48 ore di incubazione a temperatura ambiente.

L'identificazione della carica patogena, effettuata dopo la colorazione di Gram e isolamento su terreno selettivo appropriato, è stata valutata mediante API 20 E (bioMérieux, Inc, Durham, NC, USA) oppure BBL Enterotube II (BD Diagnostic Systems) per *Escherichia coli*, API Staph (bioMérieux, Inc) per *Staphylococcus aureus* e BBL Oxi/Ferm Tube II (BD Diagnostic Systems) per *Pseudomonas aeruginosa*.

La conta è stata valutata preparando delle diluizioni di  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  della sospensione microbica di prova in un diluente (soluzione fisiologica). Una aliquota di 1 ml per ogni diluizione è stata seminata, in duplicato, utilizzando la tecnica in inclusione in terreno Tryptic Soy Agar: è stato aggiunto 1 ml separatamente in ogni piastra Petri, dopodiché è stato addizionato un volume di 15 ml di TSA, precedentemente preparato, alla temperatura di 45°C.

Infine è stato determinato il numero di UFC (Unità Formante Colonia), dopo incubazione in termostato a 37°C per 20-24 h, prolungando l'incubazione per altre 20-24 ore.

È stata anche determinata la concentrazione della sospensione microbica di prova (*stock suspension*), espressa in UCF/ml, utilizzata per l'inoculo al tempo zero.

Gli esperimenti *in vitro* sono stati condotti eseguendo i campionamenti su alcune superfici, costituite dai medesimi materiali (ceramica, gomma, PVC e vetro-china) delle superfici presenti nelle aree ospede-

daliere, oggetto delle successive indagini di campo.

Questi campioni sono stati separatamente contaminati con ogni sospensione di prova, precedentemente preparata, contenente la concentrazione nota di  $30 \times 10^6$  UFC/ml per ogni ceppo di *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Successivamente i medesimi campioni così inquinati, tranne uno utilizzato come prova in bianco, sono stati trattati con la soluzione sanificante a base di probiotici.

Utilizzando piastre per il monitoraggio ambientale: *plate contact* (Rodac: *Replicate Organism Detection and Counting*) costituite da TSA e inattivanti, quali lecitina, Istitidina e Tween-20, in grado di neutralizzare eventuali residui di detergente o di disinfettante, quindi è stato possibile determinare la carica batterica di ogni singolo ceppo dopo diversi tempi di contatto.

Dopo 1 ora dalla applicazione dei prodotti PIP sulle superfici campione, inquinate con i vari ceppi microbici, la riduzione della concentrazione dei patogeni è risultata di 7 logaritmi (pari al 99,999%) rispetto alla conta iniziale.

Nelle Figure 8, 9 e 10 sono riportati i risultati ottenuti in vitro per 3 diversi prodotti probiotici specifici per la sanificazione dei pavimenti, delle superfici degli arredi e degli apparecchi sanitari.

In condizioni controllate (*in vitro*) i risultati ottenuti mostrano un abbattimento della carica dei patogeno ATCC di circa 7 log entro 1 ora dalla applicazione del prodotto con probiotici.

## PROVE IN CAMPO

Le prime sperimentazioni sono state condotte nel 2011 in alcune aree assistenziali dello stabilimento ospedaliero Arcispedale S. Anna.

Le sperimentazioni “*in campo*” si prefiggevano l’obiettivo di verificare

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

Tabella 2 – Riassunto sperimentazioni “*in campo*”

l’azione esercitata dai PIP in condizioni nosocomiali reali e quindi, in presenza di continui fenomeni di ricontaminazione delle superfici trattate.

Lo studio è stato condotto intenzionalmente in ambienti ospedalieri di non recente costruzione e privi di impianto di filtrazione e ventilazione meccanica dell’aria, al fine di rendere maggiormente critici i processi di inquinamento. Sono state quindi individuate due diverse aree assistenziali dell’Ospedale S. Anna di Ferrara, delle quali la prima costituita da un’area di Degenza di Medicina Generale e la seconda da un’area Poliambulatoriale.

Poiché entrambe le aree risultavano, a loro volta, articolate in due reparti (Sala S e Sala T nel primo caso e Oculistica/Cardiologia e Ortopedia nel secondo caso), è stato possibile condurre una sperimentazione parallela, applicando il protocollo che prevedeva l’impiego di probiotici in uno dei due reparti e il protocollo con prodotti tradizionali nel reparto rimanente della medesima area.

I prodotti utilizzati nel protocollo tradizionale erano a base di cloro, mentre come prodotto probiotico è stato utilizzato il detergente probiotico (PIP).

In questo modo si sono potuti confrontare i risultati dei diversi metodi di sanificazione in zone (della

stessa area) con medesima destinazione d’uso, tipologia di utenza e quindi, in definitiva, con medesime caratteristiche di contaminazione.

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

Per verificare la replicabilità dei risultati, si è poi pensato di invertire, dopo 1 mese, il tipo di procedura di pulizia tra i reparti di ciascuna area, continuando le sperimentazioni per un altro mese (Tabella 2).

Ogni campionamento è stato effettuato in triplo, utilizzando piastre a contatto RODAC™ (*Replicate Organism Detection and Counting*). I campionamenti sono stati condotti in diversi punti dei reparti interessati, così schematizzabili:

- inizio pavimento del corridoio di accesso al reparto;
- fine pavimento del corridoio;
- pavimento servizio igienico;
- lavello servizio igienico.

I primi due punti sono rimasti fissi durante l’intera sperimentazione, mentre quelli riguardanti il pavimento e il lavello del Servizio Igienico sono stati scelti in modo casuale (random) volta per volta (Figura 11 e 12), al fine di rappresentarne fedelmente lo stato medio di contaminazione sull’intero reparto.

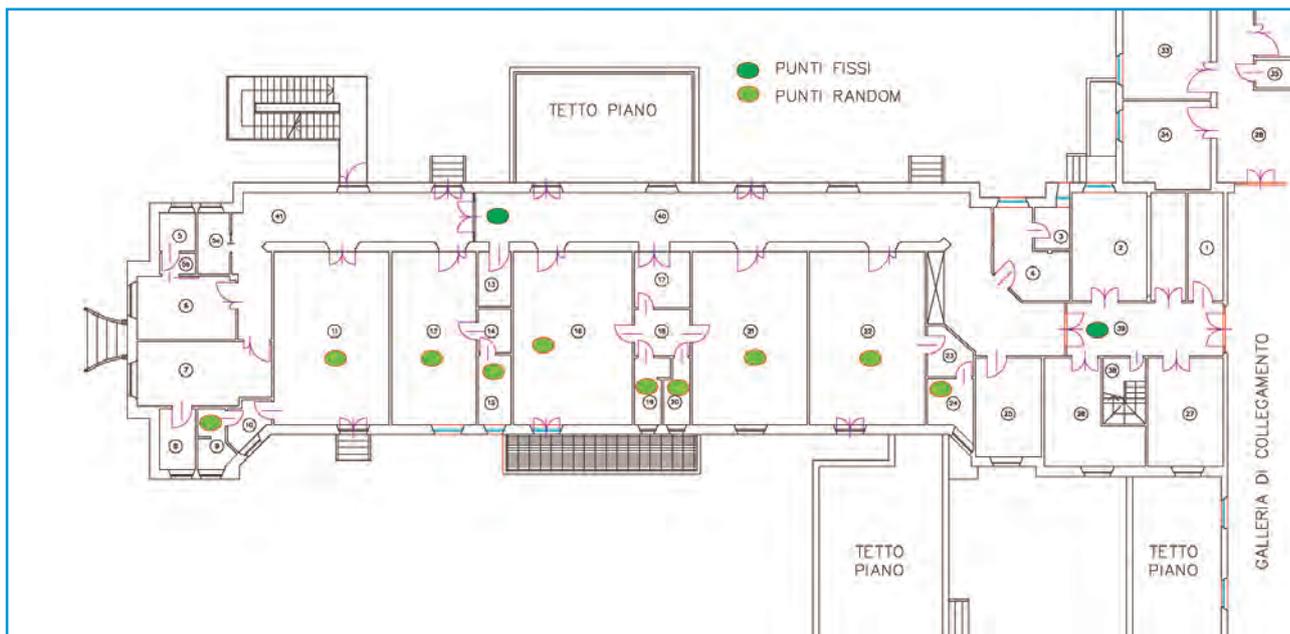


Figura 11 - Planimetria Sala S (punti di campionamento fisso in blu e random in giallo)

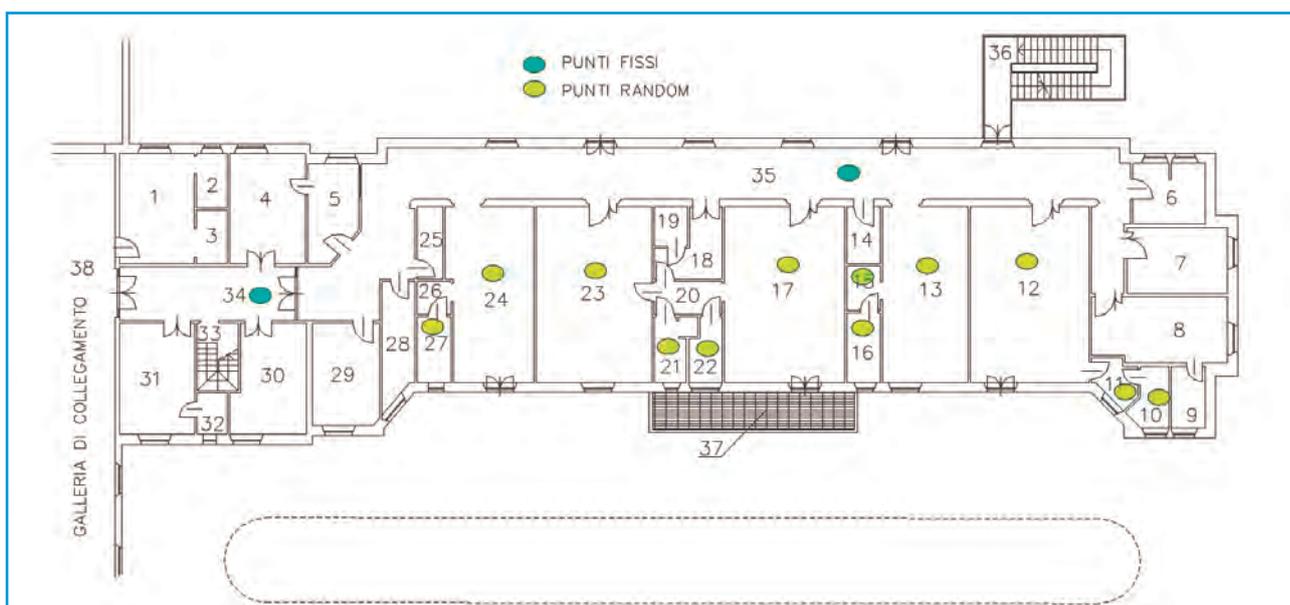


Figura 12 - Planimetria Sala T (punti di campionamento fisso in blu e random in giallo)

Le campagne di monitoraggio sono state condotte ad intervalli di tempo regolari (circa ogni 2-3 giorni), sia alle ore 07:00, immediatamente dopo gli interventi di sanificazione, che alle ore 14:00. Alcuni campionamenti sono stati effettuati anche prima dell'inizio delle attività di pulizia (circa alle ore 06:30), in modo da disporre di dati sull'andamento nel tempo della carica microbica sulle superfici di interesse, essendo questa va-

riabile in funzione della intensità dei fenomeni di ricontaminazione imputabili alle attività umane ed al passaggio di individui.

Preventivamente sono stati svolti prelievi microbiologici per la valutazione non solo della carica microbica totale iniziale esistente ma anche della carica microbica dei potenziali patogeni. Questo momento è stato denominato come Tempo zero ( $T_0$  ore 14,00).

La sperimentazione è poi prosegui-

ta con una terza Fase, iniziata in data 22.07.2011, e cioè a distanza di circa 1 mese dal termine della seconda Fase. In quest'ultimo periodo, protrattosi fino al 23.08.2011, si sono impiegati i prodotti probiotici PIP in entrambi i reparti della Degenza di Medicina, con lo scopo di verificare un eventuale ulteriore contenimento della carica patogena dopo periodi prolungati di applicazione dei PIP. Ogni campionamento è stato effettuato in

triplo (3 piastre per ogni tipologia di parametro microbiologico), per un totale di 324 prelievi per giornata di lavoro. In totale sono stati effettuati:

- 6804 prelievi nella prima fase
- 4212 prelievi nella seconda fase
- 1512 prelievi nella terza fase

per un totale di 12.528 prelievi. In totale, in questa prima ricerca sono stati effettuati complessivamente 12.528 prelievi.

La procedura di campionamento delle superfici e le analisi microbiologiche sono stati eseguite in base alle "Linee Guida CONTARP-INAIL", 2005, alla "UNI EN ISO 19698:2004" e secondo le consuetudini codificate in letteratura [12]. I risultati ottenuti da ogni singola piastra durante il campionamento in triplo hanno permesso di calcolare il valore medio di ogni parametro di interesse (conta microbica totale (TVC) e conta microbica di ogni potenziale patogeno), poi espresso come CFU/m<sup>2</sup> (unità formanti colonie per metro quadrato di superficie monitorata). Infine è stato possibile confrontare i risultati ottenuti con l'applicazione dei due diversi protocolli (quello a base di probiotici e quello chimico) e calcolare quindi l'efficacia del primo rispetto al secondo in termini di riduzione percentuale della carica dei potenziali patogeni. In particolare, tale riduzione è stata calcolata come segue:

■ per ciò che attiene al 1° mese, in base alla formula

$$rid\ perc = - \frac{V_{mi\ trad} - V_{mi\ PIP}}{V_{mi\ trad}}$$

in cui

$$V_{mi\ trad} = \frac{\sum_{15.03.11}^{14.04.11} Cp_i\ tradiz}{n}$$

$$V_{mi\ PIP} = \frac{\sum_{15.03.11}^{14.04.11} Cp_i\ PIP}{n}$$

con il seguente significato dei simboli

$V_{mi\ trad}$	valore medio dello specifico patogeno i-esimo calcolato nell'intervallo di tempo di applicazione del protocollo tradizionale (per il 1° mese Sala S e Ortopedia)
$V_{mi\ PIP}$	valore medio dello specifico patogeno i-esimo calcolato nell'intervallo di tempo di applicazione del protocollo PIP (per il 1° mese Sala T e Cardiologia Oculistica)
$Cp_i\ trad$	UFC/m <sup>2</sup> dello specifico patogeno i-esimo relativo ad uno specifico campionamento durante l'applicazione del protocollo tradizionale
$Cp_i\ PIP$	UFC/m <sup>2</sup> dello specifico patogeno i-esimo relativo ad uno specifico campionamento durante l'applicazione del protocollo PIP
n	numero di campionamenti effettuati nel periodo di interesse

per ciò che attiene al 2° mese, sempre in base alla formula

$$V_{mi\ trad} = \frac{\sum_{19.04.11}^{16.05.11} Cp_i\ tradiz}{n} \quad V_{mi\ PIP} = \frac{\sum_{19.04.11}^{16.05.11} Cp_i\ PIP}{n}$$

essendo gli intervalli temporali corrispondenti al periodo che intercorre tra il 19.04 e il 16.05.2011.

■ per ciò che attiene al 3° mese, in base alla formula

$$rid\ perc_{mese\ 3} = \frac{(V_{mi\ trad\ mese\ 1} + V_{mi\ trad\ mese\ 2}) - (V_{mi\ PIP\ mese\ 3} + V_{mi\ PIP\ mese\ 3})}{(V_{mi\ trad\ mese\ 1} + V_{mi\ trad\ mese\ 2})}$$

ovvero calcolando lo scarto percentuale tra i valori medi ottenuti nel 3° mese con i protocolli PIP 1 e PIP 2 rispetto ai valori medi ottenuti nel 1° e 2° mese con i pro-

tolli tradizionali.

In Tabella 3 sono mostrati i risultati ottenuti. Si può facilmente osservare nel tempo, passando dalla prima alla seconda e quindi alla terza

Punto di campionamento	Patogeno	1° e 2° fase MG	1° e 2° fase AP	3° fase MG
Corridoio (inizio e fine)	Staphylococcus aureus	12,16%	28,31%	81,03%
	Coliformi	82,09%	50,29%	79,72%
	Pseudomonas spp.	97,62%	42,24%	88,44%
	Candida spp.	77,54%	67,67%	68,47%
Pavimento servizio igienico	Staphylococcus aureus	58,75%	51,33%	85,88%
	Coliformi	89,15%	78,13%	78,31%
	Pseudomonas spp.	55,28%	75,94%	78,57%
	Candida spp.	82,90%	67,80%	71,78%
Lavabo servizio igienico	Staphylococcus aureus	55,74%	52,50%	95,59%
	Coliformi	81,56%	75,83%	85,12%
	Pseudomonas spp.	67,53%	50,41%	95,16%
	Candida spp.	50,38%	27,93%	94,86%

Tabella 3 – Abbattimento percentuale della carica microbica specifica ottenuta mediante l'impiego dei prodotti PIP rispetto al caso dei disinfettanti chimici a base di cloro (MG Medicina Generale, AP, Area poliambulatoriale)

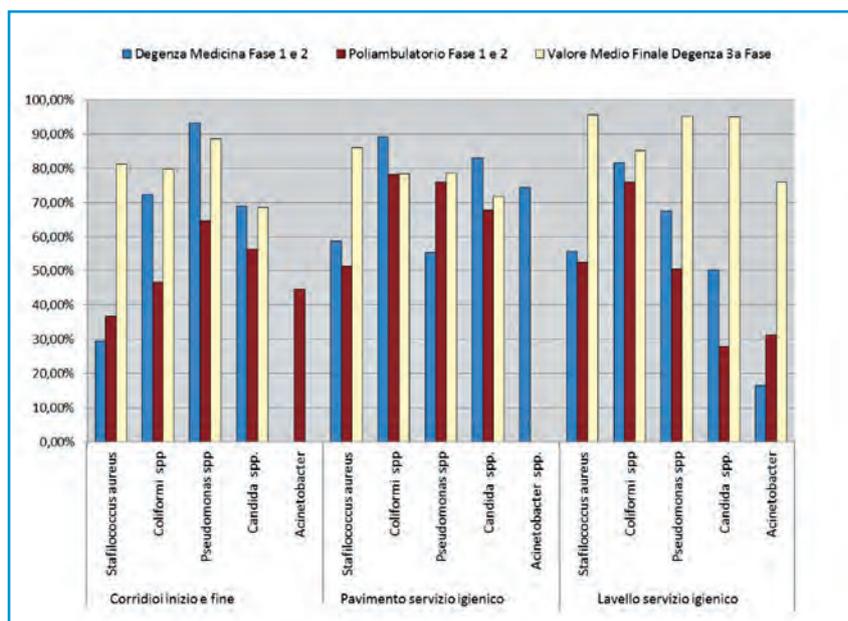


Figura 13 - Riduzione percentuale dei potenziali patogeni ottenuta con il protocollo probiotico rispetto al protocollo con disinfettanti chimici.

fase della ricerca, un progressivo aumento della riduzione percentuale della carica dei patogeni imputabile all'impiego del protocollo con PIP rispetto a quello chimico, fino a giungere a valori prossimi o superiore all'80 %.

Per chiarezza, i dati di cui alla Tabella 3 sono stati rappresentati nella Figura 13, con diverse colorazioni. E' quindi evidente che il fenomeno della riduzione della carica potenzialmente patogena da parte dei probiotici avviene nel tempo, fino a giungere ad una stabilizzazione entro il terzo mese dalla prima applicazione.

L'impiego dei protocolli a base di probiotici (Sistema PCHS) determina, quindi, una generalizzata compressione e stabilizzazione della carica patogena rispetto al caso delle procedure tradizionali.

Sperimentalmente si è constatato, anche in successive ricerche condotte presso altre realtà nosocomiali italiane, che un'azione prolungata dei protocolli probiotici (oltre 2 mesi) permette un sostanziale decremento/contenimento/stabilizzazione della carica microbica potenzialmente patogena rispetto

al caso in cui gli ambienti siano trattati con prodotti tradizionali.

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

Le sperimentazioni condotte hanno permesso di constatare (Figura 14) che, nel caso di impiego di disinfettanti tradizionali, la carica batterica potenzialmente patogena aumenta molto nell'arco di sole 7 ore (raddoppia o triplica), al contrario dei prodotti PIP, in cui tale aumento è nettamente più contenuto nell'arco delle 24 ore. Ciò a conferma del fatto che l'azione dei PIP è continuativa, andando ad incidere sul substrato nutrizionale di riferimento anche per altri microrganismi.

Questo elemento comporta una attenta riflessione sull'impiego del campionamento microbiologico delle superfici come valutazione del livello di contaminazione delle stesse.

Tale valutazione non è per nulla esaustiva se l'oscillazione della carica risulta particolarmente

ampia, come nel caso di impiego di disinfettanti chimici. Può semplicemente essere utilizzata per la valutazione della efficacia del disinfettante nell'immediato (30 minuti dopo l'applicazione), ma non per descrivere lo stato "medio" giornaliero di inquinamento di una superficie. Al contrario, è ovvio che, riducendosi l'ampiezza dell'oscillazione, come nel caso dei PIP, il conteggio delle CFU (*Colony Forming Units*) /cm<sup>2</sup> di un determinato microrganismo ha una valenza descrittiva più solida.

### Ulteriori sviluppi delle attività di ricerca

Conseguentemente ai dati positivi ottenuti nella prima fase della ricerca, si è voluto verificare l'ipotesi di una possibile relazione sussistente tra eventi infettivi (ICA) e le caratteristiche microbiologiche ambientali.

E' stata quindi attivata una seconda ricerca sperimentale, basata su approccio integrato tra metodologia di sanificazione (sistema PCHS - Sistema Probiotico di Pulizia ed Igiene) e buone prassi igieniche (*compliance* delle mani), che ha permesso di constatare, in 14 mesi di campionamenti nell'Ospedale di San Giorgio di Ferrara, una riduzione tendenziale di oltre il 60% degli eventi infettivi (ICA).

In questo passaggio, pertanto, il protocollo di buone pratiche igieniche è stato integrato con il protocollo di pulizie PCHS. Dovendosi logicamente attuare una politica a tutto campo di gestione del rischio infettivo, il protocollo di pulizia PCHS, consistente in un insieme di operazioni, tra loro coordinate, che prevedevano, tra l'altro, una adeguata formazione del personale, l'utilizzo di attrezzature, panni e materiali ad elevato contenuto tecnologico, nonché un programma di verifiche e controlli atti a garantire il raggiungimento di un idoneo livello di igiene degli am-

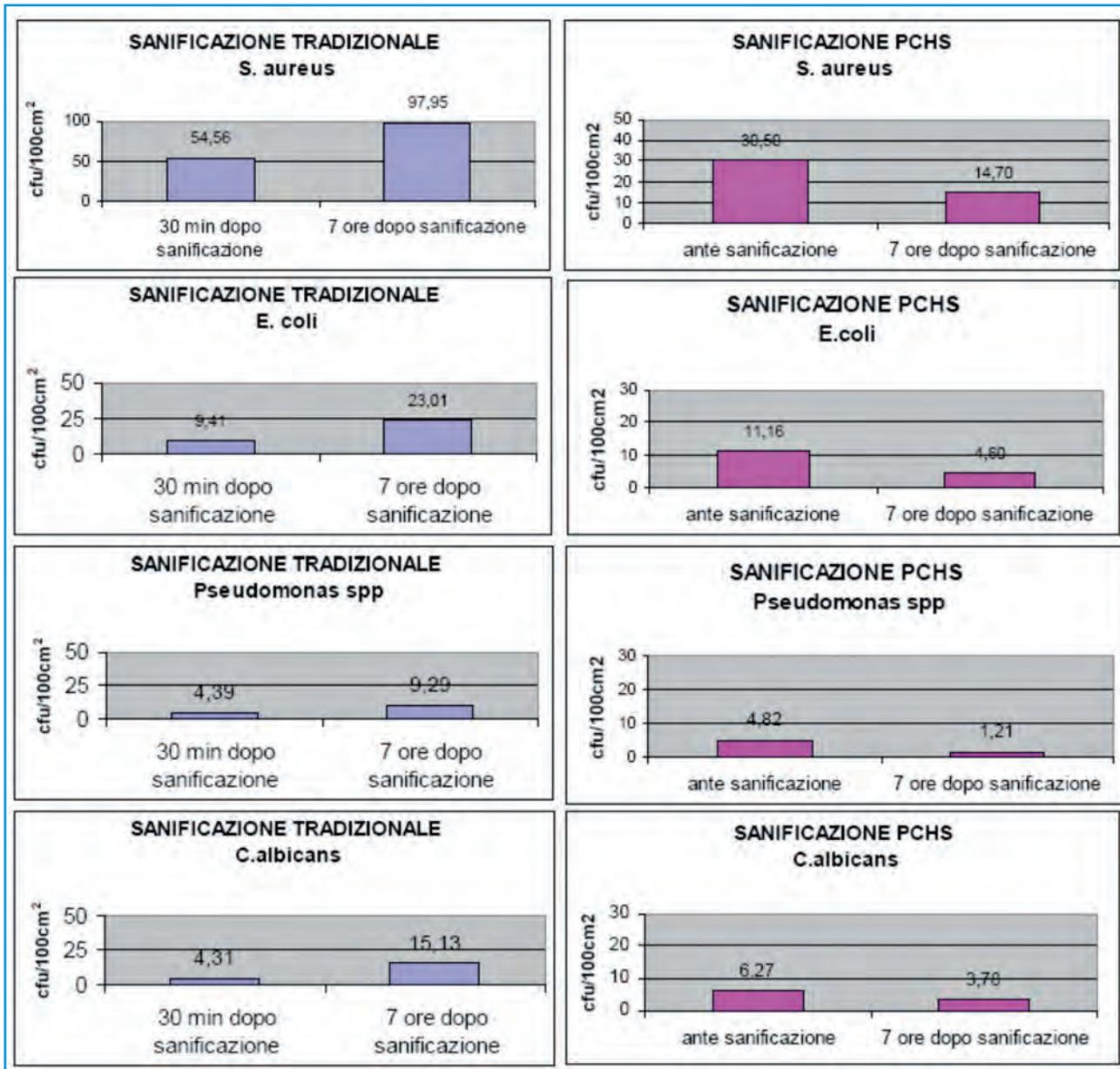


Figura 14 - Andamento nel tempo della carica dei vari microrganismi

bienti al fine di conseguire l'obiettivo finale: l'igiene dell'ambiente nosocomiale.

La nuova ricerca è stata condotta presso l'ospedale Nuovo San Giorgio di Ferrara ed è durata 14 mesi, durante i quali sono stati effettuati quasi 6.000 campionamenti microbiologici, con lo scopo di monitorare sul lungo periodo l'andamento della carica dei potenziali patogeni.

La descrizione dettagliata della ricerca è riportata in uno dei paragrafi successivi. In questa sede si vuole sottolineare che, grazie an-

che ad ulteriori ricerche, tutt'ora in corso, condotte in numerose strutture ospedaliere italiane, è stato possibile collezionare oltre 25.000 campionamenti microbiologici.

Si sono quindi potuti ricavare i grafici di cui alla Figura 15 e alla Figura 19.

L'analisi di una tale mole di dati e la disponibilità delle risultanze di un elevato numero di campionamenti (25.748) condotti in diverse realtà ospedaliere, hanno permesso un approccio più sistematico e consapevole delle procedure di

sanificazione delle degenze.

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

una compressione della carica di microrganismi potenzialmente patogeni di oltre l'80 % rispetto al caso di utilizzo di tecniche tradizionali a base di prodotti chimici; la stabilizzazione della carica medesima, sia nell'arco della giornata, con oscillazioni molto più contenute tra due successive sanificazioni,

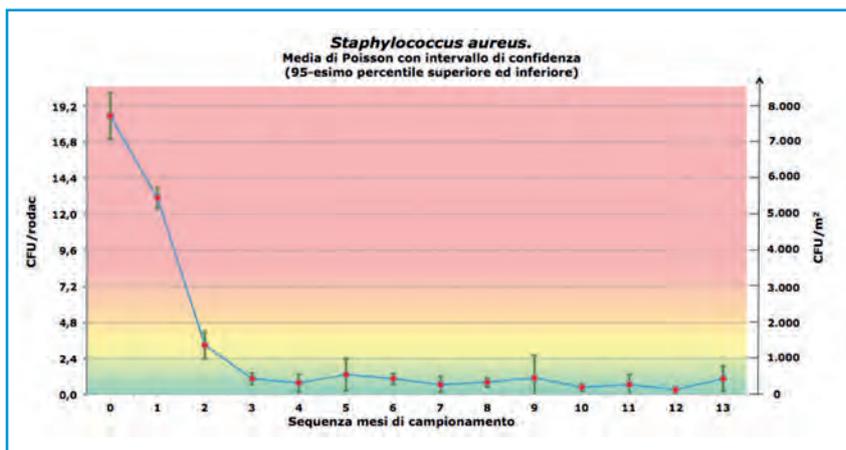


Figura 15 - Andamento della carica dello *Staphylococcus aureus*

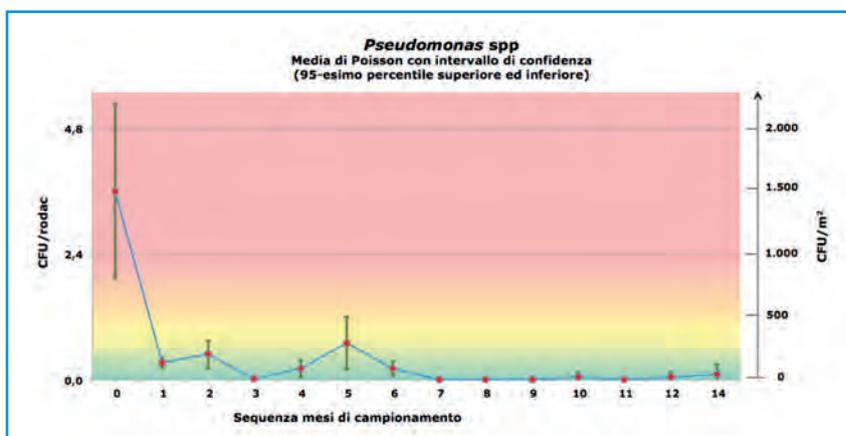


Figura 16 - Andamento della carica di *Pseudomonas spp.*

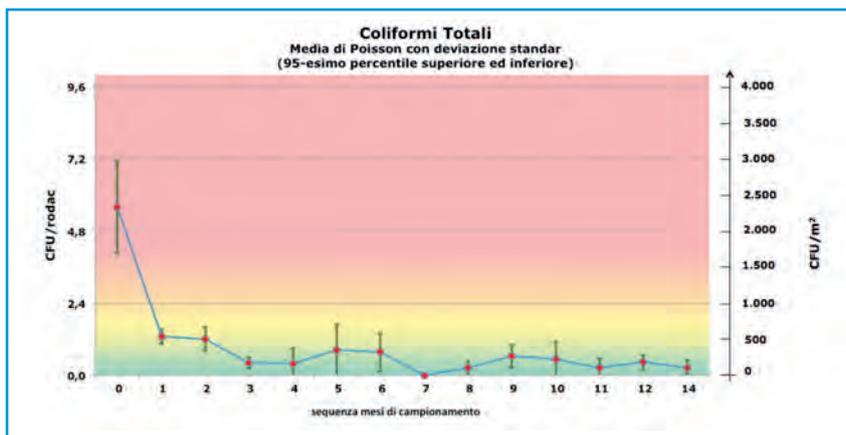


Figura 17 - Andamento della carica dei Coliformi totali

sia nei mesi successivi alla prima applicazione (in particolare a partire dal terzo mese).

La lettura dei diagrammi, riguardanti i diversi campionamenti effettuati fino ad oggi nelle varie strutture ospedaliere e per diverse superfici, supporta le precedenti

affermazioni. In questi grafici (Figura 14, Figura 15, Figura 16, Figura 17), viene mostrato l'andamento della carica dei potenziali patogeni e della carica totale.

Gli andamenti sono stati ricavati applicando l'analisi di Poisson ed i relativi intervalli di confi-

denza. L'intervallo di confidenza superiore rappresenta il 95-esimo percentile superiore (il 95 % dei dati raccolti ha un valore che sta al di sotto di tale limite), mentre l'intervallo di confidenza inferiore rappresenta il 95-esimo percentile inferiore (il 5 % dei dati ha un valore inferiore a quello indicato).

Si può notare che al mese 0, corrispondente all'inizio della prima applicazione del sistema PCHS (*Probiotic Hygiene Cleaning System*), e quindi al valore della contaminazione ottenibile mediante i prodotti chimici tradizionali, la carica dei microrganismi è significativamente più elevata che nel restante periodo, con una progressiva diminuzione, che diventa del tutto stabile a partire dal terzo mese, in corrispondenza del quale, evidentemente, la colonizzazione da parte dei *Bacillus spp.* diventa predominante.

In Figura 20 è riportato l'andamento della carica totale dei microrganismi. Si noti che nel tempo questa diminuisce notevolmente, passando da circa 92.000 UFC/m<sup>2</sup>, ad un valore prossimo a 33.000 - 42.000 UFC/m<sup>2</sup>, più che dimezzato rispetto al precedente.

Tale fenomeno non è di facile interpretazione e non è ancora stato indagato con la dovuta attenzione dal gruppo di lavoro. Riprendendo tuttavia i modelli di crescita di una popolazione (Malthus, 1798), espressi in forma più rigorosa da Darwin e Wallace, si potrebbe avanzare la seguente ipotesi: quando una popolazione diversificata satura l'ambiente, gli individui che meglio soddisfano le proprie necessità, in termini di spazio e di nutrizione, sopravvivono e lasciano discendenti (nel caso specifico *Bacillus spp.*), mentre gli altri si estinguono progressivamente senza prole, con conseguente diminuzione della popolazione iniziale.

## CONCLUSIONE

L'impiego dei probiotici (Sistema PCHS) nelle procedure di sanificazione di degenze ospedaliere si è rilevato essere una tecnica di sicuro interesse, poiché permette di ridurre, dell'80 % circa ed oltre, i livelli di carica batterica potenzialmente patogena, di fatto indipendentemente dal tipo di superfici sanificate.

Tuttavia un corretto sistema di pulizia delle degenze ospedaliere non è centrato solo sullo specifico agente o prodotto impiegato, ma su di un insieme integrato di operazioni e controlli incrociati, quale è il Sistema PCHS, in grado di garantire la struttura sanitaria, in termini di efficacia del risultato complessivo e di valorizzazione e quantificazione del risultato medesimo. Quanto affermato determina, comunque, la necessità di un salto culturale da parte degli operatori privati e pubblici del settore, determinato dalla esigenza di approfondire sotto il profilo scientifico le consuetudini in uso, allo stato dei fatti poco o per nulla, basate su idonee sperimentazioni di campo e le corrette modalità di interpretazione e valutazione dei campionamenti microbiologici, comunque condotti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M and Chiarello L. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control* 2007;35:S65-164.
2. Lanini S, Jarvis WR, Nicastrì E, et al. Healthcare-associated infection in Italy: annual point-prevalence surveys, 2002-2004. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:659-65.
3. Nicastrì E, Petrosillo N, Martini L, Larosa M, Gesu GP and Ippolito G. Prevalence of nosocomial infections in 15 Italian hospitals:

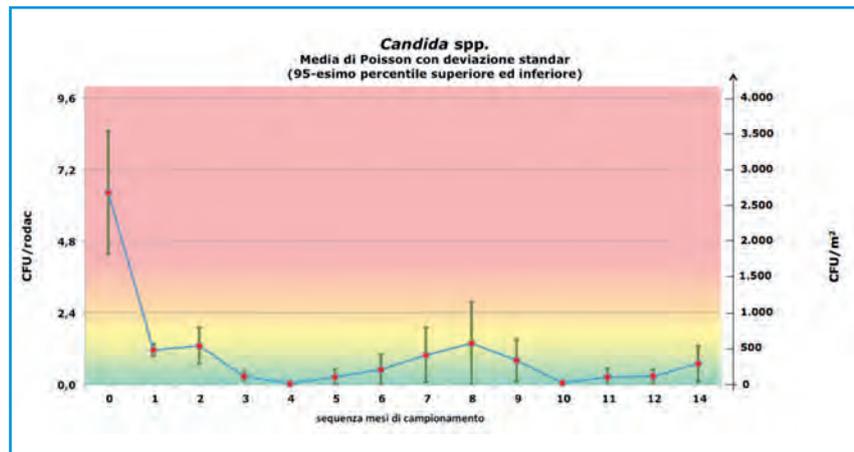


Figura 18 - Andamento della carica di *Candida* spp.

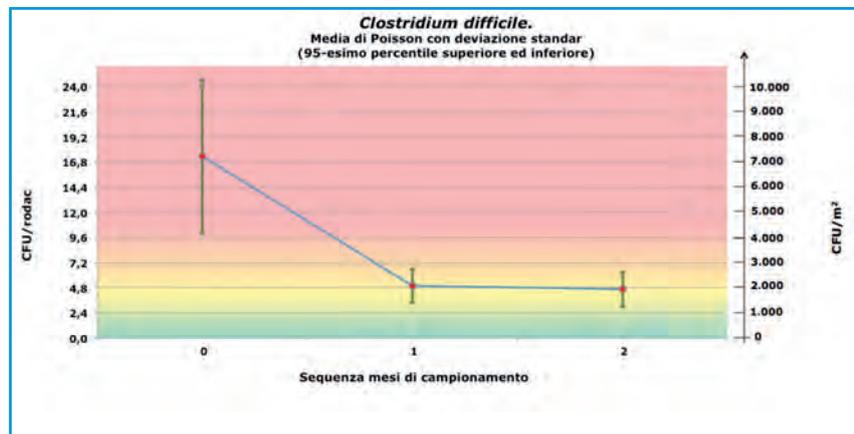


Figura 19 - Andamento della carica di *Clostridium difficile*

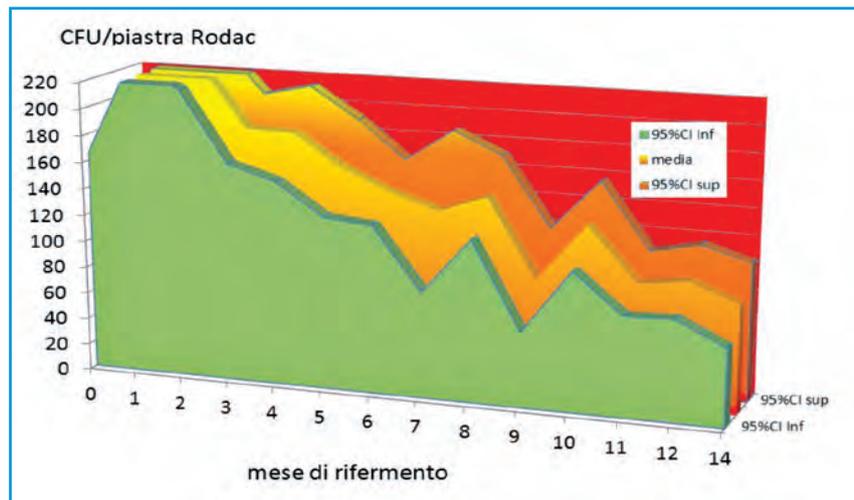


Figura 20 - Andamento della carica totale

first point prevalence study for the INF-NOS project. *Infection* 2003;31 Suppl 2:10-5.

4. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for no-

socomial infection? *Clin Infect Dis* 2004; 39:1182-9.

5. Frabetti A, Vandini A, Balboni P, Triolo F and Mazzacane S. Experimental evaluation of the efficacy of sanitation procedures in ope-

- rating rooms. *Am J Infect Control* 2009; 37:658-64.
6. Mazzacane S, Balboni PG, Vandini A, Frabetti A, Antonioli P, Manzalini MC, Rovigatti M. - Sperimentazioni di tecniche di biostabilizzazione nelle procedure di sanificazione delle degenze ospedaliere, *L'Ospedale*. 2011; n. 4/11: 52-8.
  7. Mazzacane S, Balboni PG, Vandini A, Frabetti A, Antonioli P. L'evoluzione delle procedure di sanificazione negli ospedali: prospettive di riduzione e controllo della carica batterica potenzialmente patogena mediante tecniche di stabilizzazione - *L'Ospedale*, 2012; n. 2/12: 78-83.
  8. Logan, NA. Safety of Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In *Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Applications* (Ricca E. et al., eds.). Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, UK 2004: 93-105.
  9. Hong, HA, Huang, JM, Khaneja, R, Hiep, LV, Urdaci, MC & Cutting SM. The Safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105: 510-520.
  10. Sorokulova, IB, Pinchuk, IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM & Urdaci MC. The Safety of Two *Bacillus* Probiotic Strains for Human Use. *Digestive Diseases and Sciences* 2008; 53: 954-63.
  11. Tompkins TA, Hagen KE, Wallace TD & Fillion-Forte V. Safety evaluation of two bacterial strains used in asian probiotic products. *Canadian Journal of Microbiology* 2008; 54: 391-400.
  12. Cartwright P. *Bacillus subtilis* – Identification & Safety. BA (Hons) MA MSc - Human Microbiota Specialist Probiotics International Ltd. Somerset, U.K. Issue 2 March 2009.
  13. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance<sup>2</sup> EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)<sup>3,4</sup> European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy.
  14. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal* 2005; 226: 1-12.
  15. Food and Drug Administration. Statement of Policy for Regulating Biotechnology Products. *Federal Register*, June 26 1986; 51: 23301-350.
  16. Environmental Protection Agency. Microbial products of biotechnology: final regulation under the Toxic Substances Control Act; final decision document. *Federal Register* 1997; 62: 179 10- 1795 8.
  17. Li WF, Deng B, Cui ZW, Fu LQ, Chen NN, Zhou XX, Shen WY, Yu DY. Several Indicators of Immunity and Antioxidant Activities Improved in Grass Carp Given a Diet Containing *Bacillus* Additive-*Journal of animal and Veterinary Advances* 2012; 11 (14): 2392-7.
  18. Murillo I, Villamil L. *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *J Aquac Res Development* 2011; S1:007.
  19. Zongzheng Y, Xin L, Zhong L, Jinzhao P, Jin Q, Wenyan Y. Effect of *Bacillus Subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth 2009; Vol. 2 No.4: 55
  20. Roberti R. *Informatore Fitopatologico*. Biological control of plant pathogens by *Bacillus subtilis* Selmi, C. Bologna Univ. (Italy) Jul-Aug 1999.
  21. Dancer S.J., Hospital cleaning in the 21st century. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, December 2011; Volume 30 (Issue 12): 1473-81.
  22. Endres JR, Clewell A, Jade KA, Farber T et al. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food Chem Toxicol* 2009.
  23. Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Bacillus subtilis* PB6 (*Bacillus subtilis*) as a feed additive for chickens for fattening- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA Journal* 2009; 7(9):1314.
  24. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2597.
  25. Suggested citation: EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA Journal* 2011;9(11):2445.
  26. Food and Drug Administration. Statement of Policy for Regulating Biotechnology Products. *Federal Register* June 26, 1986; 51: 23301-50.
  27. FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 2001.
  28. FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002.