

Caratteristiche generali microbiologiche dell'ambiente nosocomiale

Riassunto

Lo sviluppo, da parte dei microrganismi patogeni per la salute umana, di resistenze ad antibiotici e di fenomeni di adattamento ai disinfettanti normalmente utilizzati per le operazioni di sanificazione, ha richiesto un'indagine mirata sulle probabili cause ed i meccanismi d'azione che determinano tali fenomeni, in quanto responsabili dell'aumento dei casi di infezione in ambienti nosocomiali. Inoltre, poiché lo scopo principale per cui vengono eseguite le pratiche di sanificazione è la riduzione/eliminazione del numero di microrganismi, dopo aver valutato i pro e contro dei vari detergenti, sia tradizionali che a base di batteri sporigeni benefici (probiotici), vengono espresse le motivazioni per cui sono da preferire questi ultimi.

Alberta Vandini*, Alessia Frabetti*, Maria Teresa Camerada*, L. Lanzoni*, Sante Mazzacane*, Pier Giorgio Balboni*

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

PAROLE CHIAVE:

Biofilm, disinfettanti chimici, sanificazione, degenze ospedaliere

INTRODUZIONE

Le procedure di sanificazione hanno lo scopo di ridurre e contenere la proliferazione dei microrganismi presenti negli ambienti ospedalieri. Tutti gli ambienti, anche quelli antropici, sono colonizzati da un insieme di cellule batteriche, micotiche, protozoarie, che, convivendo insieme, producono *biofilm*, ovvero una matrice di sostanze polimeriche extracellulari (mucillagine), che le difende dagli aggressivi chimici. [1] [2]

Un *biofilm* è una comunità strutturata (aggregati multi-cellulari) di cellule batteriche vive, ma quiescenti, racchiuse in una matrice polimerica autoprodotta ed adesa ad una superficie inerte o vivente (Figura 1, 2). La letteratura scientifica continua a

riportare la formazione dei *biofilm* da parte di una serie sempre più ampia di specie microbiche: tutti i tipi di superficie possono essere colonizzate da *biofilm* microbici.

I diversi componenti biologici del *biofilm* medesimo sono in grado di sopravvivere a condizioni avverse (mancanza di acqua) pur rimanendo virulenti.

La formazione di un *biofilm* ha inizio con un processo di adesione dei microrganismi a una superficie grazie alle forze di Van der Waals (legate alla distribuzione delle cariche elettriche tra le molecole). Questi microrganismi si ancorano poi più stabilmente utilizzando molecole di adesione cellulare, mediante la costruzione di una matrice che assicura l'integrità del *biofilm*. Suc-

cessivamente il *biofilm* cresce a seguito delle divisioni cellulari e delle integrazioni di batteri esterni, anche di specie diverse (batteri Gram+ e Gram-, aerobi e anaerobi facoltativi/obbligati, miceti uni e pluricellulari, protozoi).

Il *biofilm* è definito anche come microfouling, dovuto al fenomeno di accumulo e di deposito di organismi sia unicellulari (microrganismi) che pluricellulari (biofouling), o di altre sostanze non-viventi (organiche o inorganiche).

All'interno del *biofilm* i microrganismi possono mostrare due distinte modalità di comportamento. La prima è la familiare 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 e anche, di solito, a una superficie solida. La modifica del comportamento è attivata da un meccanismo di comunicazione chimica che differisce tra le specie. Alcune specie, ad esempio, possono produrre acil-omoseril-lattoni come segnale di "quiescenza" (secondo un processo denominato quorum sensing), che induce le cellule planctoniche circostanti al cambiamento fenotipico verso lo stato sessile, attraverso una differente espressione dei geni della cellula. [3]

Il quorum sensing o comunicazione tra i batteri è autoindotto e in seguito al quale i microrganismi si sottopongono a una serie di cambiamenti fisiologici che consentono la formazione del *biofilm* extracellulare. Infatti, a seguito del quorum sensing autoindotto, i batteri possono

iniziare la produzione superficiale di polimeri extracellulari adesivi, la produzione di biosurfattante, la sporulazione, la bioluminescenza e la secrezione di sostanze nutritive; con sequestro di molecole e fattori di virulenza come conseguenza del processo di formazione del *biofilm*. I meccanismi di quorum sensing avvengono in tutti i batteri sia Gram negativi che Gram-positivi.

Nella Figura 3, dove è rappresentata la formazione del *biofilm*, vengono distinte cinque fasi successive di sviluppo: la fase reversibile di attacco iniziale (adesione caratterizzata da legami elettrostatici deboli fra i batteri e le superfici di attacco), alla quale segue, dopo pochi minuti, l'attacco irreversibile, nel quale i batteri aderiscono alla superficie mediante flagelli, fimbrie, pili e fibrille di esopolisaccaridi; definita anche fase di fissazione o irreversibile attachment. Potrebbe essere una fase ancora reversibile se si operasse accuratamente una pulizia manuale e meccanica per rimuovere lo strato cellulare. Segue la fase di moltiplicazione, comprendente una maturazione di formazione di mucopolisaccaridi per l'adesione e la maturazione all'interno di questo strato mucopolisaccaridico i batteri cominciano a moltiplicarsi creando colonie protette da queste capsule (fase irreversibile) ed infine si ha la dispersione o rilascio intermittente. In presenza di *biofilm* questo rilascio intermittente è causa di una sovrastima o di una sottostima della contaminazione microbica.

I *biofilm* sono ubiquitari e possono formarsi sui dispositivi medici, dispositivi protesici, su ogni tipo di superficie e in campo sanitario hanno un ruolo importante nella antibiotico resistenza.

La presenza dell'involucro mucopolisaccaridico agisce come un sistema di protezione che si oppone alla penetrazione dei farmaci e similmente dei disinfettanti, inoltre i microrganismi presenti nel *biofilm* mostrano

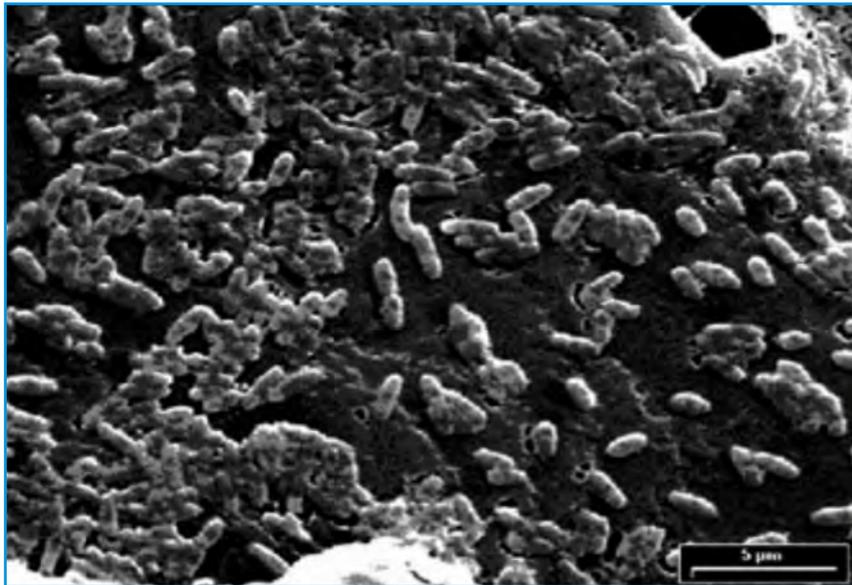


Figura 1 – Adesione batterica con formazione di microcolonie su di una superficie antropica

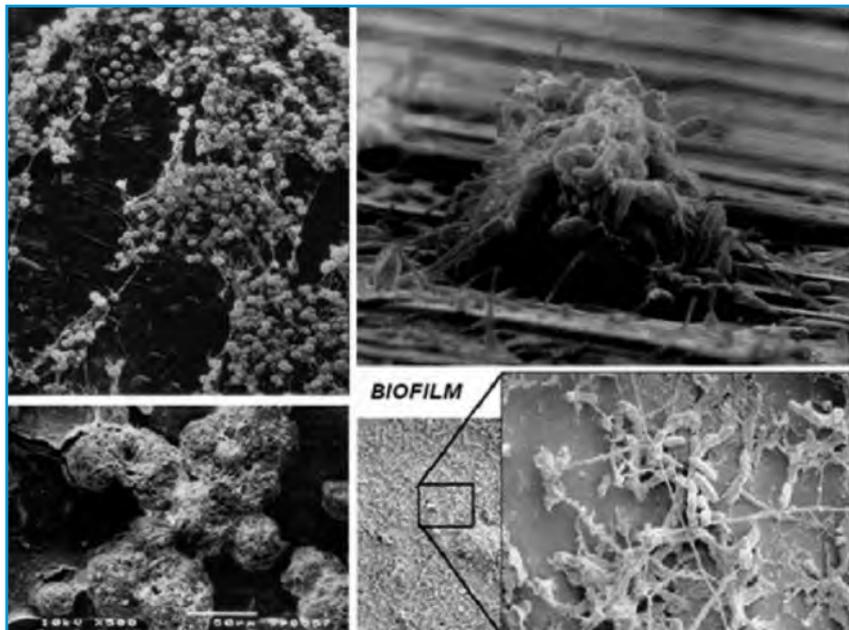


Figura 2: Microscopia elettronica del *biofilm*.



Figura 3 – Formazione del *biofilm*. Dal sito: www.mondodiscus.com, modificata.

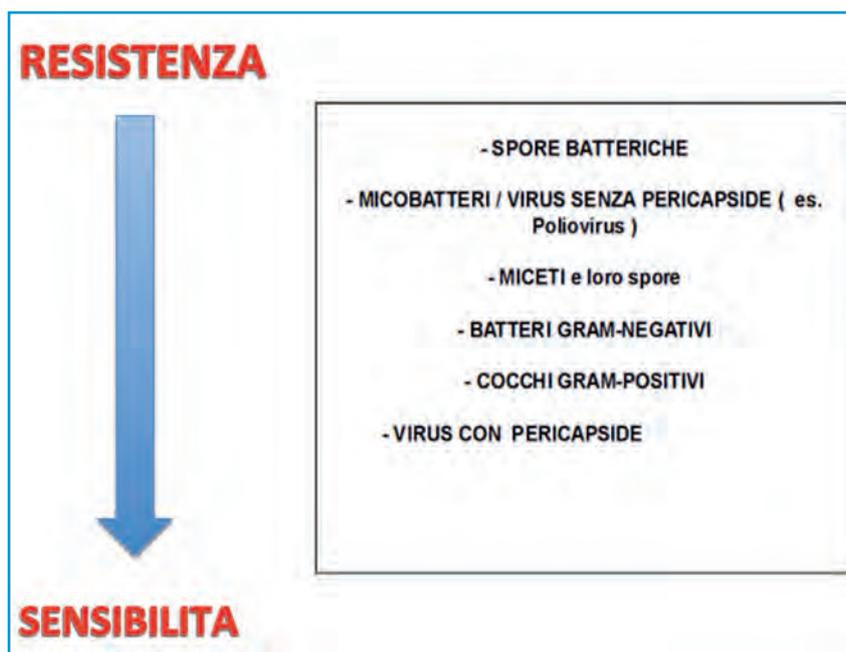


Figura 4 – Scala di resistenza e sensibilità dei microorganismi nei confronti dei disinfettanti chimici.

possono essere esposti a dosi subletali di antibiotici, provocando così una più alta incidenza di resistenze microbiche con gravi conseguenze per il paziente [5].

I gruppi di microorganismi esposti nella Figura 4 comprendono tutte le specie microbiche che sono in grado di contaminare le superfici ospedaliere di ogni genere (letti, lenzuola, pavimenti, pareti, arredi etc.), venendo poi trasmessi ai pazienti mediante contatto, tramite le mani o i guanti del personale di assistenza e dei visitatori oppure attraverso le polveri, che, una volta depositate sulle superfici, possono essere contaminate dai patogeni ivi presenti, per poi venire in parte nuovamente sospese in aria a causa dei moti convettivi naturali e di quelli indotti, imputabili agli impianti di climatizzazione, per rideposarsi successivamente sugli arredi e sulle superfici nosocomiali.

A ciò si aggiunge che negli ambienti ospedalieri la carica microbica patogena necessaria affinché insorgano delle infezioni in pazienti critici o immunocompromessi è molto ridotta e quindi anche l'efficacia delle operazioni di pulizia ha diretta influenza

sulla salute dei degenti.

La popolazione microbica è eterogenea e, a seconda delle proprie caratteristiche strutturali o metaboliche, può essere raggruppata in base ad una scala di resistenza e sensibilità nei confronti dei disinfettanti, che sono utilizzati nelle procedure di pulizia e sanificazione dell'ambiente. Le forme maggiormente resistenti sono le spore batteriche, i micobatteri e i virus senza pericapside, poi seguono i miceti, i batteri Gram negativi, i batteri Gram positivi ed infine i più sensibili ai disinfettanti sono i virus con pericapside (Human Immunodeficiency Virus e virus dell'epatite B).

Oltre alle caratteristiche proprie di ogni gruppo, il *biofilm* costituisce una barriera all'azione di molti biocidi, impedendo così sia la completa pulizia dell'ambiente che la totale eliminazione dei microorganismi, con la conseguente presenza di "survivors" (sopravvissuti) che, nel contempo, possono sviluppare resistenza all'azione dei biocidi e trasmettere questa resistenza, se genetica, a microorganismi anche di altre specie.

In base a consolidate evidenze sperimentali [6] [7], la sanificazione delle superfici e le modalità di utilizzo dei prodotti sanificanti è raccomandata in tutte le linee guida internazionali e nazionali [8] [9], rappresentando di per sé una importante procedura utile a prevenire le infezioni [10].

Comunemente, tali tecniche fanno uso di disinfettanti chimici, con conseguenti rischi per l'inquinamento ambientale e per la sicurezza degli utenti, e con notevoli criticità di risultato [11].

I disinfettanti chimici di solito usati in ambito ospedaliero devono rispettare alcune condizioni per essere efficaci, quali:

- un sufficiente tempo di contatto con la superficie da sanificare;
 - una sufficiente concentrazione, che potrebbe diminuire se è presente materiale organico;
 - un sufficiente pH, che potrebbe essere neutralizzato dalla presenza di particolari sostanze in grado di neutralizzarne l'azione.
- Non ultimo, i disinfettanti chimici sono più o meno efficaci in funzione del microorganismo da eliminare (Figura 4), perciò non è possibile impiegare un qualunque prodotto disinfettante per igienizzare una qualunque superficie.
- I fattori che influiscono sulla capacità di contaminazione dell'ambiente in relazione ai degenti sono inerenti:
- alla capacità dei microorganismi di sopravvivere, rimanendo virulenti, per lunghi periodi di tempo sulle superfici contaminate (soprattutto letti, lenzuola, comodini, pavimenti, corrimano, bagni) ;
 - alla loro capacità di colonizzare i pazienti (ad esempio *C. difficile*, *Staphylococcus Meticillina* resistenti o MRSA) anche mediante il contatto delle mani o dei guanti (personale di assistenza e dei servizi "no core")
 - al fatto che è sufficiente una dose infettante piccola in pazienti critici o immunocompromessi
 - alla relativa resistenza ai disinfet-

tanti utilizzati nella pulizia degli ambienti ospedalieri o sulla strumentazione presente.

- alla limitata efficacia biocida nel tempo, che normalmente si esaurisce nell'arco di 20-30 minuti dopo l'applicazione, con successiva crescita esponenziale degli agenti microbiologici; ciò è imputabile anche al fatto che l'azione del disinfettante determina produzione di materiale organico da decomposizione, quindi nutrizionale, che favorisce la proliferazione dei microrganismi;

- alla diversa efficacia del disinfettante in funzione delle caratteristiche fisico-chimiche del supporto trattato; lo stesso principio chimico può determinare, infatti, risultati completamente diversi su materiali differenti in funzione della struttura e dimensione dei micropori dei medesimi, delle dimensioni delle molecole dell'agente chimico e del tasso di evaporazione (tensione di vapore) alle diverse temperature, velocità e stati di umidità relativa dell'aria circostante;

- alla capacità, da parte dei microrganismi stessi, di sviluppare continue mutazioni genetiche e difese di diverso genere, atte a rendere inefficace l'azione biocida chimica, con i conseguenti fenomeni di biocida resistenza, ben descritti in letteratura;

- ai problemi allergenici e di inquinamento dell'ambiente naturale generati dall'uso massivo di sostanze chimiche che possono accumularsi in modo persistente nei grandi serbatoi naturali (suolo, acqua, aria).

Tradizionalmente le procedure di sanificazione sono effettuate mediante l'impiego di detergenti/disinfettanti chimici, che sono classificati in base ai principi attivi che a loro volta sono diretti a determinati siti bersaglio nei microrganismi.

I principali disinfettanti ad azione battericida utilizzati per la sanificazione delle superfici sono i biocidi **rilascianti Cloro** (ipocloriti): in grado di ossidare i gruppi -SH delle proteine ed inibire la sintesi del DNA

tramite clorurazione dei nucleotidi, i **Perossidi**: ossidanti tramite -PK dei gruppi -SH di enzimi e proteine e i **Cationici** (ad esempio Clorexidina, Sali d'ammonio quaternari,): inducono danni alle membrane citoplasmatiche, **Fenoli**: esercitano un'intensa azione denaturante sulle proteine danneggiando le strutture biologiche.

Tuttavia l'azione biocida ha determinato un processo di selezione naturale dei ceppi microbici potenzialmente patogeni, sempre più resistenti oltre che agli antibiotici, anche ai disinfettanti.

È emerso da uno studio pubblicato sulla rivista scientifica *Microbiology* (Journal of the Society for General Microbiology) che indica che batteri come lo *Staphylococcus aureus* sono in grado di produrre delle proteine che diffondono molte differenti sostanze chimiche tossiche al di fuori della cellula. Questi processi possono rimuovere gli antibiotici dall'interno del batterio e renderlo quindi resistente [12].

Il medesimo fenomeno è stato dimostrato anche nei confronti dei disinfettanti: lo *S. aureus* è stato esposto a basse concentrazioni di svariati biocidi, utilizzati negli ambienti ospedalieri, con la constatazione della comparsa di mutanti resistenti e l'aumento della espulsione di sostanze tossiche [13].

Tra i microrganismi considerati potenzialmente patogeni in ambito ospedaliero possono essere menzionati lo *Staphylococcus aureus* (MRSA), i coliformi (*Escherichia coli*), lo *Pseudomonas aeruginosa*, la *Candida albicans*, l'*Acinetobacter spp.* ed il *Clostridium difficile*.

Attualmente, negli ambienti nosocomiali si verifica un progressivo aumento delle resistenze batteriche agli agenti ad attività antibatterica, disinfettanti e antibiotici, a dimostrazione della capacità di adattamento dei microrganismi a diverse condizioni ambientali attraverso lo sviluppo o l'acquisizione di meccani-

smi che conferiscono loro una certa tenacità (resistenza) nei confronti di tutte le classi di principi attivi antibatterici.

Dall'ente americano di controllo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) proviene l'allarme della presenza di ceppi multi-resistenti o super-resistenti; questi super batteri sono in grado di resistere a tutti gli antibiotici disponibili, anche ai carbapenemi di ultima generazione (come i batteri Gram negativi *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*).

Negli ultimi anni lo studio di nuove formulazioni disinfettanti e/o di nuove procedure di sanificazione è orientato verso prodotti a basso impatto ambientale, detergenti ecologici, e verso prodotti a base di probiotici, che esplicano una azione di competizione interspecifica (tra specie diverse) secondo il principio di esclusione competitiva.

In commercio sono presenti e vengono applicati per procedure di pulizia e sanificazione dei prodotti nei quali sono presenti batteri, sotto forma di spore, in grado, dopo germinazione, di sviluppare una popolazione capace di entrare in competizione biologica con i microrganismi potenzialmente patogeni.

Tali batteri sporigeni appartengono al genere *Bacillus* e sono aerobio-anaerobi facoltativi, poco esigenti dal punto di vista nutrizionale e soprattutto dotati di un grande potenziale enzimatico in grado di degradare moltissimi substrati compresa la mucillagine protettiva dei *biofilm*.

Questa metodica ha perciò il vantaggio, rispetto ai biocidi considerati classici, di produrre una competizione, e quindi una compressione, continua nel tempo, nei confronti dei potenziali patogeni componenti i *biofilm* nosocomiali abbassandone il numero e soprattutto di essere ecocompatibile.

I batteri *Bacillus* sono in grado di effettuare la sporogenesi (formazione della spora) e la germinazione, cioè il passaggio dalla spora alla forma

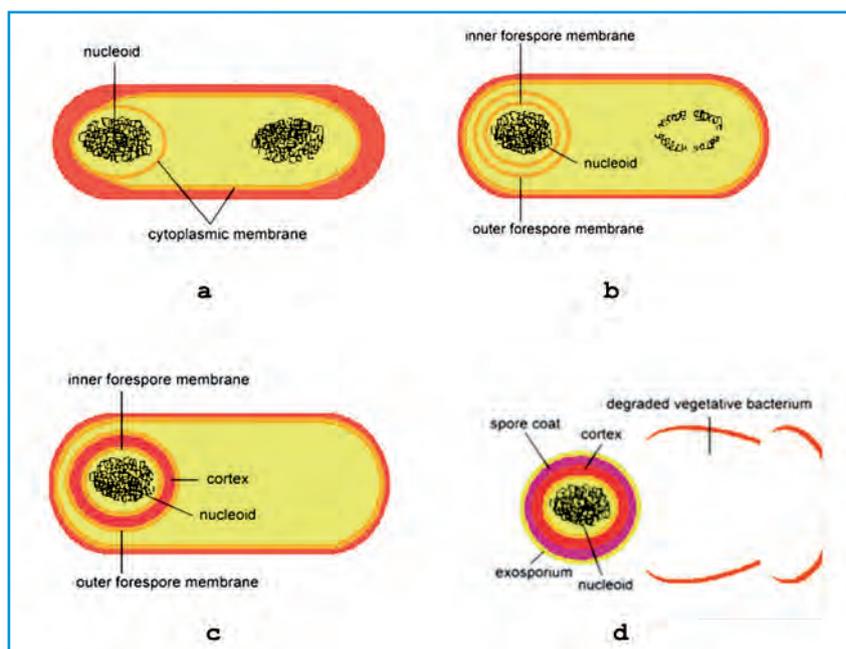


Figura 5 – Sporogenesi 6-8 ore. Dal sito: xfiles.farmacia.uniba.it, modificata.

vitale vegetativa, in base alle condizioni esterne.

La sporogenesi avviene in un intervallo di tempo di circa 6 – 8 ore (Figura 5), questa fase può essere inibita dai disinfettanti chimici ed è caratterizzata dalla formazione, all'interno della cellula batterica di una separazione della membrana citoplasmatica ed alla formazione di peptidoglicano sul doppio strato fosfolipidico della spora, in modo da costituire la corteccia (*cortex*) della spora stessa (strato molto spesso di peptidoglicano, che si differenzia per la presenza di lattami dell'acido muramico). Si stratificano dei fasci del peptidoglicano per formare gli strati esterni alla corteccia, le tuniche costituite da diversi strati di natura proteica, lamellari e fibrillari, carat-

terizzate da un elevato contenuto di cisteina con la formazione di ponti disolfuro. Contemporaneamente alla formazione delle strutture esterne avviene la disidratazione del citoplasma sporale. Alla fine della sporogenesi si otterrà una spora completa con un corredo genico simile a quello della cellula madre, e viene rilasciata all'esterno per lisi della cellula batterica che l'ha prodotta. Il core di un'endospora matura è molto diverso dalla cellula vegetativa da cui si origina, infatti l'abbondante quantità di dipicolinato di calcio al suo interno determina una riduzione della quantità di acqua, e conseguente stato di parziale disidratazione del core stesso. Ciò aumenta la resistenza dell'endospora al calore e ad alcune sostanze chimiche come il perossido

di idrogeno, e causa la parziale inattività degli enzimi metabolici.

Le spore contengono una grande quantità di proteine core specifiche chiamate *small acid-soluble spore proteins* (SASP).

Le SASP sono prodotte durante il processo di sporulazione ed hanno almeno due funzioni; legano fortemente il DNA nel core proteggendolo dai potenziali danni delle radiazioni ultraviolette, dall'essiccazione, dal calore e funzionano da fonte di aminoacidi, carbonio ed energia per la formazione della nuova cellula vegetativa durante il processo di germinazione.

Una spora batterica può rimanere inattiva per molti anni, ma può essere riconvertita a cellula vegetativa piuttosto rapidamente attraverso la germinazione (Figura 6).

In questo processo si distinguono 3 stadi:

- l'attivazione indotta ad esempio dalla presenza di nutrienti specifici,
- la germinazione, che è un processo rapido ed è una fase essenzialmente catabolica, di demolizione di diverse componenti della spora: si osserva perdita del dipicolinato di calcio, di componenti della corteccia e degradazione delle SASP,
- ed infine avviene l'ultimo stadio, ovvero l'esocrescita.

L'esocrescita comporta un visibile rigonfiamento dovuto all'assorbimento di acqua, inizio del metabolismo respiratorio e una notevole attività biosintetica con produzione di nuovo RNA, proteine e DNA. La cellula emerge dal rivestimento sporale iniziando infine la divisione cellulare.

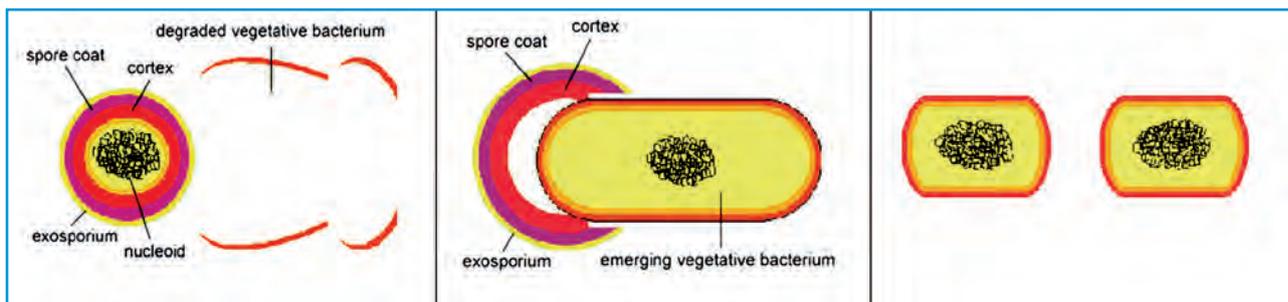


Figura 6 – Germinazione delle spore (circa 90 minuti). Dal sito: xfiles.farmacia.uniba.it, modificata.

Il processo di sporulazione maggiormente studiato è quello del *Bacillus subtilis*, nel quale è stato rilevato che la sporulazione richiede l'attivazione di geni specifici, i cui prodotti non sono espressi nel batterio nella fase vegetativa dello sviluppo. L'espressione regolata nel tempo di questi geni è mediata da subunità della RNA-polimerasi, chiamate *fattori sigma*, che riconoscono i promotori specifici dei geni della sporulazione e permettono l'inizio della loro trascrizione e l'inizio della sporogenesi (Figura 5 e 6). Questo processo di sporulazione e germinazione avviene più volte nei batteri sporigeni probiotici utilizzati nei prodotti, che compongono l'innovato sistema di igiene e sanificazione definito Probiotic Cleaning Hygien System (PCHS). Questo sistema impiega i batteri sporigeni *Bacillus species* (Figura 7) (soprattutto *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*) per contribuire a garantire una igiene stabile unendo l'azione di "biostabilizzazione" dei batteri probiotici con l'efficacia di materiali impiegati e specificatamente studiati.

BIBLIOGRAFIA

[1] Kadry AA, Fouda SI, Shibl AM, Abu El-Asrar AA. Impact of slime dispersants and anti-adhesives on in vitro biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lenses and on antibiotic activities. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Mar; 63(3): 480-4.
 [2] Durán EL, Mujica MT, Jewtuchowicz VM, Finkelievich JL, Pironi MV, Iovannitti CA. [Examination of the genetic variability among biofilm-forming *Candida albicans* clinical isolates]. *Rev Iberoam Microcol.* 2007 Dec 31; 24(4):268-71.
 [3] Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms in *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, giugno 2009; vol. 73, n. 2: 310-47.

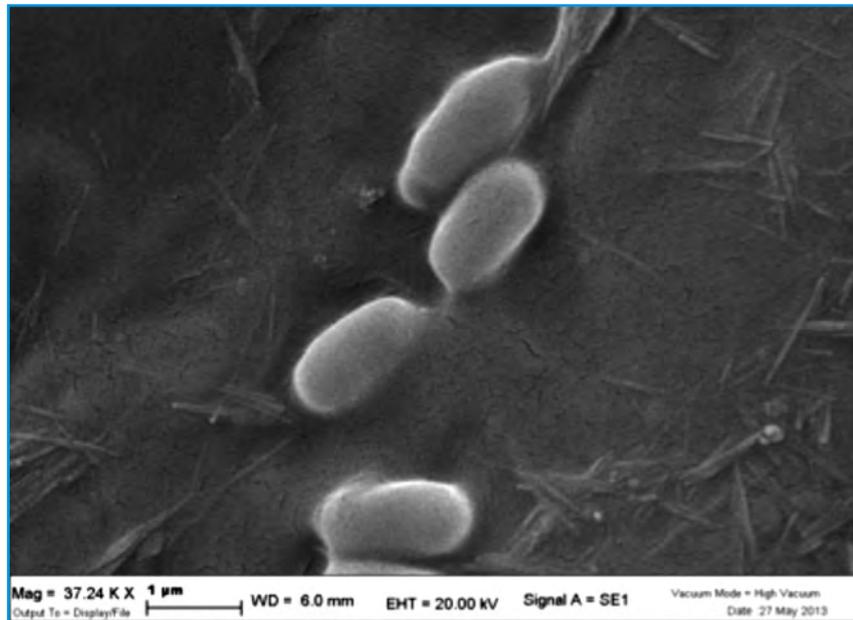


Figura 7 – Spore di *Bacillus subtilis*

[4] Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation in *Nature*, agosto 2005; vol. 436, n. 7054: 1171-5.
 [5] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Apr; 35(4): 322-32. Epub 2010 Feb 10. Review.
 [6] Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis* 2004;39:1182-9
 [7] Frabetti A, Vandini A, Balboni P, Triolo F and Mazzacane S. Experimental evaluation of the efficacy of sanitation procedures in operating rooms *American Journal Infect Control* 2009;37:658-64.
 [8] Alicia J. Mangram, MD; Teresa C. Horan, MPH, CIC; Michele L. Pearson, MD; Leah Christine Silver, BS; William R. Jarvis, MD. *Guideline for Prevention of Surgical Site Infection.* Center for Disease Control, Atlanta, U.S.A., 1999 .
 [9] Finzi G. et al.; "Linee guida per il corretto utilizzo degli antisettici – disinfettanti,

Edicom Editore, 2008.

[10] Mazzacane S, Frabetti A, Vandini A, Migliori D, Balboni P. L'igiene nei reparti ospedalieri: correlazioni tra le procedure di sanificazione ed i fattori di contaminazione. Conferenza Nazionale ANMDO – 12,14 Settembre 2007, Rimini – pubblicato sulla rivista L'Ospedale
 [11] A. Frabetti, A. Vandini, D. Migliori, A. Cusumano, E. Righini, P. Balboni, S. Mazzacane Efficacia ed efficienza dei protocolli di pulizia e disinfezione in sale operatorie Congresso ANMDO 2006 – Associazione Nazionale Medici Direzioni Ospedaliere - 21-24 settembre 2006, Lecce
 [12] Aurélie A. Huet, Jose L. Raygada, Kabir Mendiratta, Susan M. Seo, and Glenn W. Kaatz. Multi-drug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiology* October 2008 154:3144-3153;
 [13] *Science* 4 January 2013: Dynamic Persistence of Antibiotic-Stressed *Mycobacteria* Vol. 339 n. 6115 pp. 91-95, dal sito: www.sciencemag.org/content/339/6115/91.abstract