

Verringerung der Inzidenz von therapieassoziierten Infektionen durch ein Hygienesystem auf der Grundlage probiotischer Reinigungsmittel: eine multizentrische, prospektive Interventionsstudie

Elisabetta Caselli^{1,2*}, Silvio Brusaferrero³, Maddalena Coccagna², Luca Arnoldo³, Filippo Berloco⁴, Paola Antonioli⁵, Rosanna Tarricone⁶, Gabriele Pelissero⁷, Silvano Nola⁸, Vicenza La Fauci⁹, Alessandro Conte³, Lorenzo Tognon¹⁰, Giovanni Villone¹¹, Nello Trua¹², Sante Mazzacane², für die SAN-ICA-Studiengruppe^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12¶}

1 Abteilung für Mikrobiologie und medizinische Genetik, Fakultät für Medizinwissenschaft, Universität Ferrara, Ferrara, Italien; **2** CIAS - Interfakultäres Forschungszentrum, Fakultäten für Medizinwissenschaft und Architektur, Universität Ferrara, Ferrara, Italien; **3** Fakultät für Medizin, Universität Udine, Udine, Italien; **4** Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rom, Italien; **5** Fakultät zur Prävention und Eindämmung von Infektionen sowie für ihr Risikomanagement, S. Anna Universitätskrankenhaus, Ferrara, Italien; **6** Centre for Research on Health and Social Care Management (CERGAS), Fakultät für Politikanalyse und öffentliche Verwaltung, Bocconi-Universität, Mailand, Italien; **7** Fakultät für öffentliche Gesundheit sowie experimentelle und forensische Medizin, Universität Pavia, Pavia, Italien; **8** Azienda USL di Ferrara, Ferrara, Italien; **9** Fakultät für biomedizinische Wissenschaften sowie dentale und funktionelle Bildgebung, Universität Messina, Messina, Italien; **10** Ospedale di Santa Maria del Prato, Feltre (Belluno), Italien; **11** Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedali Riuniti di Foggia, Foggia, Italien; **12** Ospedale Sant'Antonio Abate, Tolmezzo (Udine), Italien

¶ Die vollständige Mitgliedschaft der Autorengruppe ist der Danksagung zu entnehmen.

* csb@unife.it

Abstract

Therapieassoziierte Infektionen (*Healthcare Associated Infections*, HAI) bieten weltweit Anlass zur Sorge und stellen eine zusätzliche Bedrohung durch die zunehmende Arzneimittelresistenz von HAI-assoziierten Krankheitserregern dar. Des Weiteren trägt die hartnäckige Kontamination von Oberflächen in den Krankenhäusern zur HAI-Übertragung bei und kann nicht wirksam durch herkömmliche Reinigungsverfahren eingedämmt werden, welche eine neuerliche Kontamination nicht verhindern können, stark umweltschädlich sind und die Selektion von arzneimittelresistenten mikrobiellen Stämmen begünstigen können. Bei der Suche nach wirksamen Verfahren hat sich ein ökologisch nachhaltiges Reinigungssystem auf Grundlage probiotischer Produkte (*Probiotic Cleaning Hygiene System*, PCHS) vor kurzem für die stabile Verringerung von Krankheitserregern auf Oberflächen ohne Selektion antibiotikaresistenter Arten bewährt. Im Rahmen dieser Studie soll festgestellt werden, ob sich die Anwendung eines PCHS auf die Inzidenz von HAI auswirkt. Über 18 Monate wurde auf den Stationen für innere Medizin von sechs staatlichen Krankenhäusern (1. Januar 2016 bis zum 30. Juni 2017) eine

ÖFFENTLICH ZUGÄNGLICH

Als Quellennachweis wie folgt anzugeben:

Caselli E., Brusaferrero S., Coccagna M., Arnoldo L., Berloco F., Antonioli P. et al. (2018) Verringerung der Inzidenz von therapieassoziierten Infektionen durch ein Hygienesystem auf der Grundlage probiotischer Reinigungsmittel: eine multizentrische, prospektive Interventionsstudie. PLoS ONE 13(7): e0199616.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616>

Herausgeber: John Conly, Universität Calgary, KANADA

Vorlage: 8. Februar 2018

Annahme: 11. Juni 2018

Publikation: 12. Juli 2018

Urheberrecht: © 2018 Caselli et al. Dies ist ein öffentlich zugänglicher Artikel, der gemäß den Bedingungen der Lizenz *Creative Commons Attribution* vervielfältigt wird, die eine uneingeschränkte Verwendung, Vervielfältigung und Wiedergabe durch beliebige Medien erlaubt, vorausgesetzt, der ursprüngliche Verfasser und die Quelle werden genannt.

Erklärung über die Datenverfügbarkeit: Alle erheblichen Daten sind im Artikel und den Dateien mit unterstützenden Informationen,

einschließlich der Daten im öffentlichen Repository BioStudies (<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/>), Zugriffsnummer S-BSST75, enthalten.

Finanzierung: Die Verfasser erklären, uneingeschränkt Mittel von Copma Scrl (Via Veneziani 32, 44124 Ferrara, Italien) erhalten zu haben. Dies nahm jedoch keinerlei Einfluss auf das Design und die Durchführung der Studie, die Datenerfassung, -verwaltung, -auswertung und -auslegung, die Erstellung, Überarbeitung oder Genehmigung des Manuskripts und die Entscheidung, das Manuskript zur Publikation einzureichen.

Interessenkonflikt: Die Verfasser erklären, dass sie uneingeschränkt Mittel von Copma scrl (Ferrara, Italien) erhalten haben, dass die Geldgeber jedoch nicht auf das Studiendesign, die Datenerfassung und -auswertung, die Entscheidung zur Veröffentlichung des Manuskripts oder seine Erstellung Einfluss genommen haben. Die Richtlinie von PLOS ONE betreffend die Weitergabe von Daten und Materialien wurde ungeachtet dessen durch die Verfasser beachtet.

multizentrische Interventionsstudie im Prä-Post-Design durchgeführt. Die Intervention sah die Ersetzung herkömmlicher Reinigungsverfahren durch das PCHS vor, wobei alle anderen Verfahren, welche auf die Eindämmung von HAI Einfluss nehmen könnten, unverändert blieben. Der primäre Endpunkt war die HAI-Inzidenz im Zeitraum vor und nach der Intervention. Zeitgleich wurde die Gesamtkeimzahl auf Oberflächen gemessen. Insgesamt wurden 11.842 Patienten und 24.875 Umgebungsproben untersucht. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem PCHS und einem erheblichen Rückgang der kumulativen HAI-Inzidenz von insgesamt 4,8% (284 Patienten mit HAI von insgesamt 5.930 Patienten) auf 2,3% (128 Patienten mit HAI von insgesamt 5.531 Patienten) (OR = 0,44, Konfidenzintervall (KI) 95% 0,35-0,54) ($P < 0,0001$) nachgewiesen werden. Zudem konnte das PCHS im Unterschied zu den herkömmlichen Reinigungssystemen mit einem stabilen Rückgang von Krankheitserregern auf Oberflächen (mittlerer Rückgang 83%, Bereich 70-96,3%) und einer zeitgleichen Verringerung von bis zu 2 Log der Arzneimittelresistenzgene der Mikrobiota auf der Oberfläche ($P < 0,0001$; $P_c = 0,008$) in Verbindung gebracht werden. Im Rahmen unserer Studie gewannen wir Erkenntnisse, welche den Einfluss eines Reinigungsverfahrens auf die HAI-Inzidenz belegen und bestätigen, dass die Anwendung eines Verfahrens auf der Grundlage umweltfreundlicher, probiotischer Reinigungsmittel mit einer erheblichen Verringerung des Risikos, an einer HAI während des stationären Krankenhausaufenthalts zu erkranken, in Zusammenhang gebracht werden kann. Nach Vorliegen des Nachweises in einem größeren Erfahrungsfeld und anderen Zielgruppen könnte dieser ökologisch nachhaltige Ansatz als Bestandteil von Strategien zur Eindämmung und Prävention von Infektionen (IPC) in Erwägung gezogen werden.

Registrierung der Studie - ISRCTN International Clinical Trials Registry, ISRCTN58986947

Einführung

Therapieassoziierte Infektionen (*Healthcare Associated Infections*, HAI) bieten weltweit Anlass zur Sorge und beeinträchtigen das klinische Ergebnis von bis zu 15% aller stationär aufgenommenen Patienten weltweit [1]. In Europa erkranken jährlich ungefähr 3,2 Mio. Patienten an HAI und 37.000 sterben in direkter Folge der HAI sowie ferner aufgrund der zunehmenden Mehrfachresistenz gegen Arzneimittel (*multi-drug resistance*, MDR) der HAI-assoziierten Krankheitserreger [1, 2]. In italienischen Krankenhäusern durchgeführte Studien ergaben eine HAI-Inzidenz zwischen 5% und 10% mit einer Sterblichkeitsrate von bis zu 20%-30% [3-5].

Andererseits ist bekannt, dass die Oberflächen in Krankenhäusern hartnäckig mit zahlreichen Mikroorganismen kontaminiert sind, welche zur HAI-Übertragung führen können [6-11], da Oberflächen Reservoirs

für diverse Krankheitserreger sind, die von den stationär aufgenommenen Patienten und dem Personal im Krankenhaus verbreitet werden [6, 8, 10-15]. Die Eindämmung der Oberflächenkontamination erfolgt bis dato durch herkömmliche Reinigungsverfahren mit chemischen Produkten, welche an ihre Grenzen stoßen, da sie die neuerliche Kontamination nicht verhindern können [16-19], stark umweltschädlich sind und zur Selektion von desinfektionsmittelbeständigen und sogar antibiotikaresistenten Krankheitserregern [20, 21] und möglicherweise sogar zur Ausbreitung und Zunahme der HAI-assoziierten MDR-Krankheitserreger beitragen können [22, 23].

Vor kurzem wurde die „Gesundheit“ von Oberflächen in Krankenhäusern anhand der Gesundheit des menschlichen Körpers überdacht, wodurch man zu dem Schluss gelangte, dass anstelle einer Beseitigung aller Krankheitserreger die Infektionsprävention mitunter wirksamer wäre, wenn diese Krankheitserreger durch nützliche Mikroben ersetzt werden [24, 25]. In diesem Sinne wurde kürzlich ein Reinigungsverfahren auf der Grundlage ökologisch nachhaltiger Produkte, die Sporen von *Bacillus*-Probiotika enthalten (probiotisches Reinigungs- und Hygienesystem, PCHS) untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses für stationär aufgenommene Patienten sicher ist [26], es in der Lage ist, die Krankheitserreger auf Oberflächen stabil um bis zu 90% mehr als herkömmliche Desinfektionsmittel zu vermindern [27, 28] und es nicht nach resistenten Stämmen selektiert, sondern diese vielmehr reduziert [29], ohne dass es zu einer Erhöhung der Reinigungs- und Hygienekosten kommt [27, 30]. Im Rahmen einer 18-monatigen, multizentrischen Interventionsstudie (vom 1. Januar 2016 bis zum 30. Juni 2017) in sechs italienischen Krankenhäusern sollte die Auswirkung auf die HAI-Inzidenz untersucht werden, um festzustellen, ob die einmalige Anwendung eines innovativen, ökologisch nachhaltigen mikrobiellen Reinigungsverfahrens Einfluss auf die HAI-Inzidenz nehmen kann.

Methoden

Studiendesign und -teilnehmer

Eine multizentrische, prospektive Interventionsstudie im Prä-Post-Design, in deren Rahmen zeitgleich die Kontamination von Oberflächen und die HAI-Inzidenz analysiert wurden, wurde an sechs öffentlichen, mittelgroßen bis großen italienischen Krankenhäusern über einen Zeitraum von 18 Monaten (vom 1. Januar 2016 bis zum 30. Juni 2017) durchgeführt. Der Studienprüfplan wurde von der jeweiligen institutionellen Ethikkommission der teilnehmenden Krankenhäuser genehmigt. Die Studie wurde in das ISRCTN-Register (ISRCTN58986947) eingetragen.

Die Eignungskriterien für die eingeschlossenen Krankenhäuser waren unter anderem: i) Genehmigung durch die örtliche Ethikkommission vor

Einschluss in die Studie, ii) Existenz von Stationen für innere Medizin/Geriatrie und Neurologie (welche im Rahmen der Studie untersucht wurden), iii) Größe - mehr als 100 Betten für stationär aufgenommene Patienten, iv) Existenz eines bewährten HAI-Kontrollprogramms und eines Infektionsbekämpfungsteams, v) Einverständnis, keine neuen Verfahren zur Eindämmung und Prävention von Infektionen (ICP) während der gesamten Studiendauer einzuführen, die sich möglicherweise auf die HAI-Inzidenz auswirken könnten, hiervon ausgenommen sind die in den eingeschlossenen Krankenhausstationen bereits bestehenden Verfahren sowie jene, die zum Management möglicher Ausbrüche notwendig sind.

Die eingeschlossenen Krankenhäuser befinden sich in unterschiedlichen Regionen Italiens (Norden, Zentrum und Süden) und wurden nach dem Zufallsprinzip einer von zwei Interventionsgruppen (I_1 , I_2) zugeordnet. Es wurde ein weiteres Krankenhaus, das alle Eignungskriterien erfüllte, als externer zeitgleicher Kontrollparameter ($_{ext}C$) eingeschlossen. In jenem Krankenhaus wurde keine Maßnahme umgesetzt, sondern es wurde nur auf seine HAI-Inzidenz und die Gesamtkeimzahl in der Umgebung untersucht. Die Gruppe I_1 bestand aus drei Krankenhäusern, die am 1. Januar 2016 in die Studie aufgenommen wurden (Feltre, Rom, Foggia); die Gruppe I_2 bestand aus zwei Krankenhäusern, die fünf Monate später, sprich am 1. Mai 2016, in die Studie aufgenommen wurden (Vigevano und Tolmezzo); das Krankenhaus $_{ext}C$ wurde ab dem 1. Mai 2016 ebenso wie ein Krankenhaus in der Gruppe I_2 (Messina) untersucht. Die Randomisierung wurde von einem unabhängigen Prüfer mithilfe computergenerierter zufälliger Zahlen durchgeführt.

Die Maßnahme bestand ausschließlich in der Einführung eines PCHS-Verfahrens (eines von Copma, Ferrara, Italien, patentierten Systems), bei dem herkömmliche chemische (chlorhaltige) Reinigungsprodukte ersetzt werden. Die teilnehmenden Krankenhäuser erklärten sich bereit, mit Ausnahme der zum Zeitpunkt des Einschlusses bereits angewendeten Verfahren während der gesamten Studie keine anderen Verfahren einzuführen, die sich möglicherweise auf die HAI-Inzidenz niederschlagen könnten. Das Reinigungspersonal in allen Krankenhäusern, an denen die Maßnahme umgesetzt wurde, blieb während der Studie unverändert und wurde angemessen in der korrekten Anwendung des PCHS geschult. Im Konkreten wurden keine allgemeinen Reinigungsaspekte behandelt, da die Schulung auf die korrekte Zubereitung und Anwendung der PCHS-Reinigungsmittel beschränkt war. Es wurden keine sonstigen Unterschiede - weder in der Anzahl und Qualifikation des Reinigungspersonals noch in der Häufigkeit des Verfahrens - eingeführt, sodass das veränderte Reinigungssystem vom Reinigungspersonal, den Gesundheitsfachkräften und den Patienten nicht anders wahrgenommen wurde. Die Gesundheitsfachkräfte, die für die Datenextraktion verantwortlichen Personen und die Patienten hatten keine Kenntnis von der Änderung des Reinigungssystems.

Die Studie bestand aus zwei Phasen: einer 6-monatigen Prä-Interventionsphase (Prä-PCHS), während der die Krankenhäuser weiterhin die herkömmlichen Reinigungsverfahren mit chemischen Produkten anwandten, und einer 6-monatigen Postinterventionsphase (PCHS), während der das PCHS routinemäßig eingesetzt wurde, wobei ein Abstand von mindestens zwei Monaten zwischen den zwei Phasen bei Einführung des PCHS lag.

Alle in die teilnehmenden Stationen in der Prä-PCHS- und PCHS-Phase stationär neu aufgenommenen Patienten wurden in die Studie aufgenommen und auf das Auftreten einer HAI untersucht. Beim Einschluss der Patienten wurde nicht nach Alter oder Geschlecht unterschieden und ihre Identität wurde absolut anonym gehalten, sodass das Einholen einer Einverständniserklärung nicht erforderlich war. Die Untersuchung auf HAI war in allen teilnehmenden Krankenhäusern bereits zuvor, jedoch nicht im Konkreten für die Studie durchgeführt worden. Während der Studie wurde täglich und ununterbrochen auf HAI kontrolliert, um ihre tatsächliche Inzidenz zu ermitteln. Die Patienten, die bereits zu Beginn der Prä-PCHS- und PCHS-Phase aufgenommen waren und im Zeitfenster zwischen der Prä-PCHS- und PCHS-Phase aufgenommen wurden, wurden ausgeschlossen. Die Beobachtung der Patienten endete jeweils am letzten Tag der Prä-PCHS- bzw. PCHS-Phase.

HAI-Analysen

Jede HAI, die während der Beobachtungszeiträume bei den in die teilnehmenden Krankenhausstationen stationär aufgenommenen Patienten in den zwei untersuchten Phasen eintrat, wurde anhand der vom Europäischen Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) festgelegten Kriterien nachgewiesen [31]. Die Studie umfasste alle HAI-Arten: Harnwegsinfektionen (UTI), Infektionen der Blutbahn (BSI), einschließlich Zentralvenenkatheter (CVC)-bedingte, systemisch-klinische Sepsis, Magen-Darm-Infektionen (GI), Infektionen der Haut und des Weichgewebes, Pneumonie, Infektionen der unteren Atemwege (LRI), postoperative Wundinfektionen (SSI), Infektionen des Reproduktionstrakts, Infektionen der Augen, Ohren, Nase und des Rachens oder Mundes (EENT), Infektionen der Knochen und Gelenke, Infektionen des Bauchraums und nicht näher bestimmte Infektionen.

Die ätiologischen HAI-Erreger wurden anhand von routinemäßigen Diagnosetests im mikrobiologischen Labor jedes Krankenhauses untersucht. Das herkömmliche Diagnoseverfahren jedes Krankenhauses wurde nicht verändert, außer für die *Bacillus*-Arten, auf die alle klinischen Proben routinemäßig untersucht wurden.

Umgebungsprobenahme und Analysen

Die Mikrobiota auf den Oberflächen in den Krankenhäusern wurden monatlich von einem zentralen Team (CIAS-Zentrum, Universität

Ferrara) untersucht. Hierfür wurden zwei Proben an drei Stellen/Zimmer, wie zuvor beschrieben [27, 29], in 3-6 randomisierten Räumen/Krankenhaus (jeweils in Krankenhäusern mit ungefähr 100 Stationsbetten für stationär aufgenommene Patienten) genommen. Die Gesamtbakterienzahl, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Mycetes*, *Pseudomonas spp.* und *Clostridium difficile* wurden auf speziellen Rodac-Kontaktplatten quantifiziert (CFU/m²). Vierteljährlich (zweimal in der Prä-PCHS-Phase und zweimal in der PCHS-Phase) wurden die gleichen Stellen auch anhand von molekularen Assays, wie zuvor beschrieben [29], analysiert. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Gesamtbakterienzahl, die *Bacillus*-Zahl und das Mikrobiota-Resistom jeweils anhand eines quantitativen *panB*-Echtzeit-PCR (*panB*-qPCR), *spo0A*-qPCR und eines qPCR-Microarray auf 84 Resistenzgene (Antibiotikaresistenzgene nach Qiagen, BAID-1901ZRA, Hilden, Deutschland) quantifiziert wurden. Außerdem wurde das Resistom in vier PCHS-*Bacillus*-Isolaten aus jeder Probenahmereihe in der PCHS-Phase analysiert.

Datenerfassung und -management

Medizinische Fachkräfte (standardmäßig rekrutiert und geschult) erfassten ununterbrochen Daten aus den Krankenakten der Patienten in einer standardisierten Tabelle für jedes Krankenhaus. Die Fachkräfte, die die klinischen Daten erfassten, hatten nur Kenntnis von einer Studie über die Inzidenz, die während des gesamten Studienzeitraums (18 Monate) durchgeführt werden sollte, und waren im Hinblick auf die Interventionszeit und die Krankenhausgruppen verblindet.

Für jeden stationär aufgenommenen Patienten wurde eine vorläufige elektronische Krankenakte mit allgemeinen Daten ausgefüllt: Geschlecht, Alter, Herkunft, Datum der stationären Aufnahme, Diagnose bei der Aufnahme, Vorliegen konkreter Risikofaktoren, Antibiotikatherapie in den zwei Wochen vor der stationären Aufnahme, Vorliegen einer Besiedlung durch alerte Mikroorganismen, das mögliche Vorliegen einer Infektion bei der stationären Aufnahme und ihre ätiologischen Erreger.

Ein zweites Formular, das im Fall des HAI-Eintritts zu vervollständigen war, umfasste Informationen über den HAI-Beginn, den betroffenen Bereich, den ätiologischen Erreger, die Therapie mit Medikamenten und das Abklingen/den Ausgang der Infektion. Alle Daten wurden anonymisiert und zentral über eine sichere, kennwortgeschützte Website übermittelt. Ein zentrales Team stand während der gesamten Studie bereit, um Informatikprobleme zu lösen, die Daten zu standardisieren sowie auf ihre Vollständigkeit und Konsistenz zu prüfen. Die für die Datenanalyse verantwortlichen Personen waren im Hinblick auf die Interventionsdauer und die Zuordnung des Krankenhauses verblindet. Ein Anteil von mindestens 10 erfassten HAI je Krankenhausumgebung wurde durch eine verblindete zweite Fachkraft

überprüft, um das Risiko einer falschen Interpretation der Infektionen auf ein Minimum zu beschränken.

Ferner wurden die Daten über die Gesamtkeimzahl, die monatlich vom zentralen Team (Universität Ferrara) erfasst wurden, auf die gleiche kennwortgeschützte Website hochgeladen.

Ergebnismessungen

Die primäre Ergebnismessung war eine Verringerung der HAI-Inzidenz in der PCHS-Phase im Vergleich zur Prä-PCHS-Phase. Abweichungen der Infektionsraten wurden sowohl als kumulative Inzidenz je 100 stationär aufgenommenen Patienten als auch als HAI-Inzidenzraten je 1.000 Patiententage analysiert. Die sekundären Ergebnismessungen waren qualitative und quantitative Charakterisierungen der Gesamtkeimzahl auf den Oberflächen in den untersuchten Bereichen der Krankenhäuser.

Statistische Methoden

Die Teststärke wurde auf Grundlage der stationären Aufnahmen und der HAI-Inzidenzraten italienischer Krankenhäuser geschätzt [3-5]. Die Stichprobengröße wurde berechnet, wobei von einer Teststärke von 80% ausgegangen wurde, um eine Verringerung der Inzidenz von Infektionen um mindestens 25% ausgehend von einer hypothetischen Rate von 4% unter der Annahme eines zweiseitigen Tests mit einem Alpha-Niveau von 0,05 erkennen zu können. Die Stichprobengröße umfasste 10.476 Patienten.

Statistische Analysen wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Tests, Kolmogorow-Smirnow-Tests zur Beurteilung des Normalzustands, parametrischer (t-Test nach Student) und nicht parametrischer Tests (nach Mann-Whitney), eines Chi-Quadrat-Tests auf Assoziation und einer multivariablen Analyse (logistische Regression) unter der Annahme eines P -Werts von mindestens $<0,05$ als statistisch signifikant durchgeführt. Das multivariable Modell wurde unter Einschluss aller Parameter entwickelt, die eine statistisch signifikante Korrelation mit dem HAI-Eintritt durch eine univariate Analyse nachwies. Zur Analyse der Microarray-Daten wurde eine Bonferroni-Korrektur auf die multiplen Vergleiche angewandt (ein P_c -Wert $<0,05$ wurde als signifikant erachtet). Die Analysen erfolgten mithilfe der Software SPSS20® Statistics von IBM® (IBM, Bologna, Italien).

Rekrutierung

Alle eingeschlossenen Krankenhäuser schlossen die Studie ab, sodass eine unterbrechungslose Kontrolle des 6-monatigen Zeitraums vor der Intervention (Prä-PCHS-Phase) und des 6-monatigen Zeitraums während der Intervention (PCHS-Phase) gewährleistet wurde (Abb. 1). Insgesamt wurden im Rahmen der Studie 11.842 Patienten untersucht, davon entfielen 11.461 auf die Interventionskrankenhäuser I_1 und I_2 und 381

auf das externe Kontrollkrankenhaus (Tabelle 1). Es wurden insgesamt 24.875 Umgebungsproben ausgewertet.

Ergebnisse

Auswirkung der Reinigung auf die HAI-Inzidenz

Insgesamt wurden 11.842 Patienten untersucht, die alle in einer Station für innere Medizin eines der eingeschlossenen Krankenhäuser stationär aufgenommen waren. Dies diente der Analyse der HAI-Inzidenz in einer möglichst homogenen Patientenstichprobe.

Tabelle 1 fasst die wesentlichen Charakteristiken der untersuchten Population nach teilnehmendem Krankenhaus zusammen. Die kumulative HAI-Inzidenz (Patienten mit HAI/eingeschlossene Patienten) ging in der PCHS-Phase im Vergleich zur Prä-PCHS-Phase in den Krankenhäusern I₁ und I₂ erheblich von 4,8% (283/5.930) auf 2,3% (128/5.531) (Bereich 1,3-3,7%) ($P < 0,0001$) unabhängig des Standorts und des Zeitpunkts des Einschlusses in die Studie zurück. Die HAI-Inzidenzrate je 1.000 Patiententage ging von 5,4 (314/57.742) auf 2,4 (141/58.201) mit einem Inzidenzratenverhältnis von 0,45 (KI 95%, 0,36-0,54) zurück. Der Rückgang war in jedem Krankenhaus, einschließlich der Einrichtung, eindeutig nachweisbar, die bereits zuvor eine sehr niedrige HAI-Inzidenz aufwies (Tolmezzo, von 2,1% auf 1,7%). Eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Verringerung wurde auch im externen Kontrollkrankenhaus beobachtet, wo sich die HAI-Gesamtzahl auf 15 Infektionen bei 12 Patienten im ersten 6-monatigen Zeitraum und auf 16 Infektionen bei 16 Patienten im zweiten 6-monatigen Zeitraum mit einer kumulativen Inzidenzrate von 8,2% bzw. 6,8% (OR = 0,82; KI 95%, 0,37-1,78; $P = 0,6$) und einer relativen Inzidenzrate je 1.000 Patiententage von 9,4 (15/1.600) bzw. 7,0 (16/2.279) (OR = 0,75; KI 95%, 0,37-1,54) belief.

Die Analyse der HAI-Inzidenzraten auf zweimonatlicher Basis in der Prä-PCHS- und der PCHS-Phase konnte keinen rückläufigen Trend in der Prä-PCHS-Phase, sprich vor der Intervention, nachweisen, während eine stabile Verringerung nach der Einführung des PCHS-Reinigungsverfahrens beobachtet werden konnte (Abb. 2).

Die zentralen klinischen Merkmale der beobachteten Patienten in der Prä-PCHS- und PCHS-Phase der Studie ähnelten einander stark, wie ausführlicher Tabelle 2 entnommen werden kann. Die Ergebnisse aus der univariaten Analyse bestätigten die in der Fachliteratur bereits erwähnten Risikofaktoren für den Eintritt einer HAI und legten unter anderem eine positive Korrelation mit der Präsenz eines Blasen- oder Zentralvenenkatheters und dem zunehmenden Alter nahe, während sich eine Schutzwirkung aus den Faktoren männlich und selbstversorgend (S1-Tabelle) ergab.

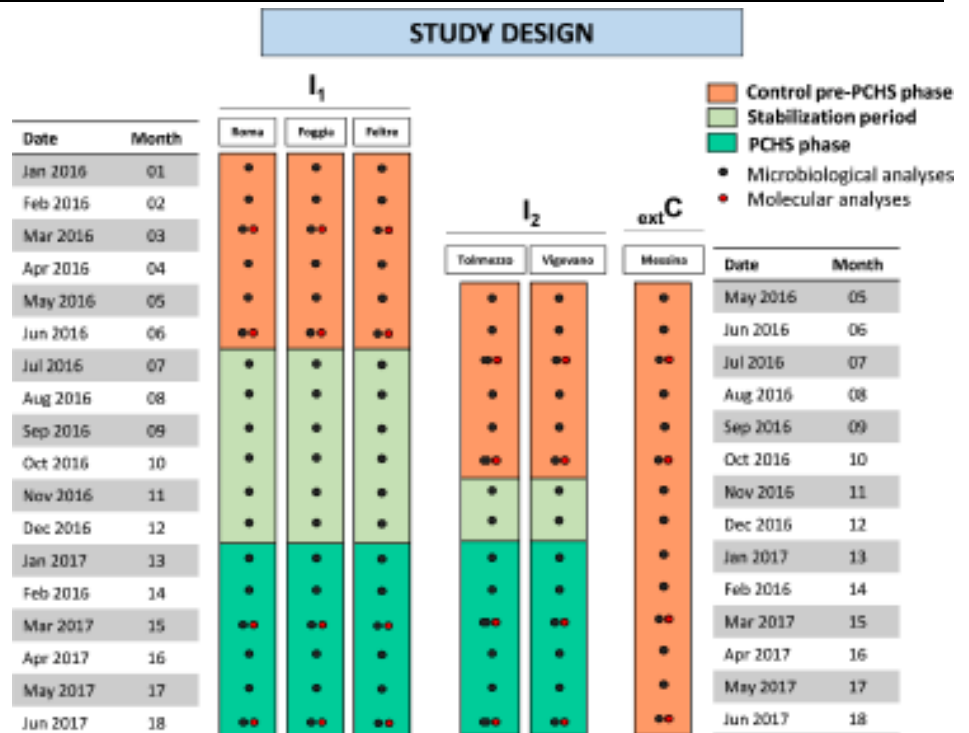


Abb. 1. Grafische Darstellung des Studiendesigns. Sechs italienische Krankenhäuser aus verschiedenen Regionen Italiens wurden in die Studie eingeschlossen (Norden: Feltre, Tolmezzo, Vigevano; Zentrum: Rom; Süden: Foggia, Messina). Fünf Krankenhäuser wurden nach dem Zufallsprinzip einer der zwei Interventionsgruppen (I₁, I₂) zugeordnet und ein weiteres Krankenhaus wurde aufgenommen, welches eine externe Kontrolle (ext^C) bot. Die Gruppe I₁ bestand aus den Krankenhäusern in Rom, Foggia und Feltre, die am 1. Januar 2016 in die Studie aufgenommen wurden. Die Gruppe I₂ bestand aus den Krankenhäusern in Vigevano und Tolmezzo, die fünf Monate später, am 1. Mai 2016, in die Studie aufgenommen wurden. Als ext^C-Krankenhaus wurde das Krankenhaus in Messina ausgewählt. Dieses erhielt keine Intervention und wurde ab dem 1. Mai 2016 untersucht. Die Studienphasen sind farblich gekennzeichnet: orange - 6-monatige Präinterventionsphase (Prä-PCHS); hellgrün - Stabilisierungsphase, als PCHS eingeführt wurde; grün - 6-monatige Postinterventionsphase (PCHS), während der PCHS routinemäßig angewandt wurde. Die Probenahme für die mikrobiologischen Analysen wird durch die Kreise angegeben: Herkömmliche mikrobiologische Analysen wurden an allen eingeschlossenen Krankenhäusern monatlich (schwarze Kreise) und molekulare Analysen vierteljährlich (rote Kreise) durchgeführt.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.g001>

Unter allen festgestellten HAI waren Harnwegsinfektionen (UTI) die am häufigsten auftretende Infektionsart (Tabelle 3), gefolgt von Infektionen der Blutbahn (BSI), systemisch-klinischer Sepsis, Magen-Darm-Infektionen (GI), Infektionen der Haut und Weichteile sowie Atemwegsinfektionen. Nach der PCHS-Intervention konnte die kumulative Inzidenz der häufigsten HAI gesenkt werden: UTI von 3% (179/5.930) auf 1,2% (70/5.531), Infektionen der Blutbahn (BSI) von 0,9% (54/5.930) auf 0,6% (31/5.531), klinische Sepsis von 0,4% (22/5.930) auf 0,1% (5/5.531), Magen-Darm-Infektionen von 0,3% (17/5.930) auf 0,1% (6/5.531) und Infektionen der Haut und der Weichteile von 0,3% (16/5.930) auf 0,1% (6/5.531). Allerdings

veränderte sich die relative Gesamtkeimzahl einer jeden HAI-Art in der PCHS-Phase nicht wesentlich gegenüber der Prä-PCHS-Phase.

Ferner ging die Anzahl von HAI-assoziierten Mikroorganismen (in HAI-Patienten nachgewiesen) erheblich von 332 in der Prä-PCHS-Phase auf 137 in der PCHS-Phase zurück (Tabelle 4), während der relative Prozentsatz der isolierten Mikroorganismen unverändert blieb: *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. mirabilis* und *P. aeruginosa* waren de facto die am häufigsten vorkommenden Isolate in beiden Phasen.

Tabelle 1. Charakteristika in der Population von Studienteilnehmern in der Prä-PCHS- und der PCHS-Phase, stratifiziert nach eingeschlossenen Krankenhäusern.

Table 1. Population characteristics of study participants in pre-PCHS and PCHS phases, stratified by enrolled hospitals.

Group	Healthcare Structure	Patients No.			Age (mean±SD)		Length of stay (mean±SD)		Patients with at least one HAI No. (%)		Statistical significance
		Total	Pre-PCHS	PCHS	Pre-PCHS	PCHS	Pre-PCHS	PCHS	Pre-PCHS	PCHS	
I ₁	Feltre	2,812	1,599	1,213	73.1±16.4	74.9±15.4	8.7±5.7	10.0±6.1	77 (4.8%)	30 (2.5%)	P = 0.0013 OR, 0.50 95% CI, 0.33–0.77
	Foggia	1,951	966	985	72.4±15.9	74.7±14.8	9.9±5.4	12.0±7.1	106 (11.0%)	36 (3.7%)	P<0.0001 OR, 0.31 95% CI, 0.21–0.45
	Roma	3,116	1,611	1,505	68.0±17.8	68.1±17.2	10.4±8.9	11.0±7.3	50 (3.1%)	20 (1.3%)	P = 0.0008 OR, 0.42 95% CI, 0.25–0.71
I ₂	Tolmezzo	2,453	1,186	1,267	74.3±14.3	75.9±13.3	10.6±9.8	9.8±6.3	25 (2.1%)	21 (1.7%)	P = 0.4111 OR, 0.78 95% CI, 0.44–1.41
	Vigevano	1,129	568	561	72.7±15.5	72.6±16.1	8.9±5.4	9.6±6.2	26 (4.6%)	21 (3.7%)	P = 0.4829 OR, 0.81 95% CI, 0.45–1.46
Tot. (I ₁ +I ₂)		11,461	5,930	5,531	71.8±16.4	73.0±15.8	9.7±7.6	10.5±6.7	284 (4.8%)	128 (2.3%)	P<0.0001 OR, 0.47 95% CI, 0.38–0.58
extC	Messina	381	146	235	71.3±14.9	72.3±15.7	11.6±8.9	9.7±5.7	12 (8.2%)	16 (6.8%)	P = 0.6080 OR, 0.82 95% CI, 0.37–1.78

I₁ - Interventionsgruppe 1; I₂ - Interventionsgruppe 2; extC - externes Kontrollkrankenhaus

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.t001>

Wichtig zu erwähnen ist, dass keine durch PCHS-abgeleitete *Bacilli* verursachten Infektionen bei den stationär aufgenommenen Patienten in den eingeschlossenen Einrichtungen festgestellt werden konnten, was die Abwesenheit von Infektionsrisiken in Verbindung mit der Verwendung von PCHS-*Bacilli* im Einklang mit früheren Studien bestätigt.

Die relative Rolle von PCHS bei der Verminderung des Auftretens von HAI wurde durch ein multivariablen Modell unter Einschluss aller Parameter erforscht, die durch eine univariate Analyse als positiv mit dem Auftreten von HAI assoziierten Variablen festgestellt wurden. Die Ergebnisse (zusammengefasst in Tabelle 5) bestätigten zwar das Vorliegen eines Blasen- oder Zentralvenenkatheters als statistisch signifikante Risikofaktoren (OR = 2,68; KI 95%, 2,10-3,41 bzw. OR = 1,99; KI 95%, 1,40-2,82), belegten hinsichtlich der Verwendung des PCHS jedoch eine statistisch signifikante, eigenständige Schutzwirkung (OR = 0,44, KI 95%, 0,35-0,54) (P<0,0001).

Abb. 2. HAI-Inzidenzraten in den Interventionskrankenhäusern I₁ und I₂. Die Ergebnisse sind in Form des zweimonatigen Werts der Inzidenzrate je 1.000 Patiententage für die Prä-PCHS-Phase (rot) und die PCHS-Phase (blau) bei einem KI von jeweils 95% angegeben.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.g002>

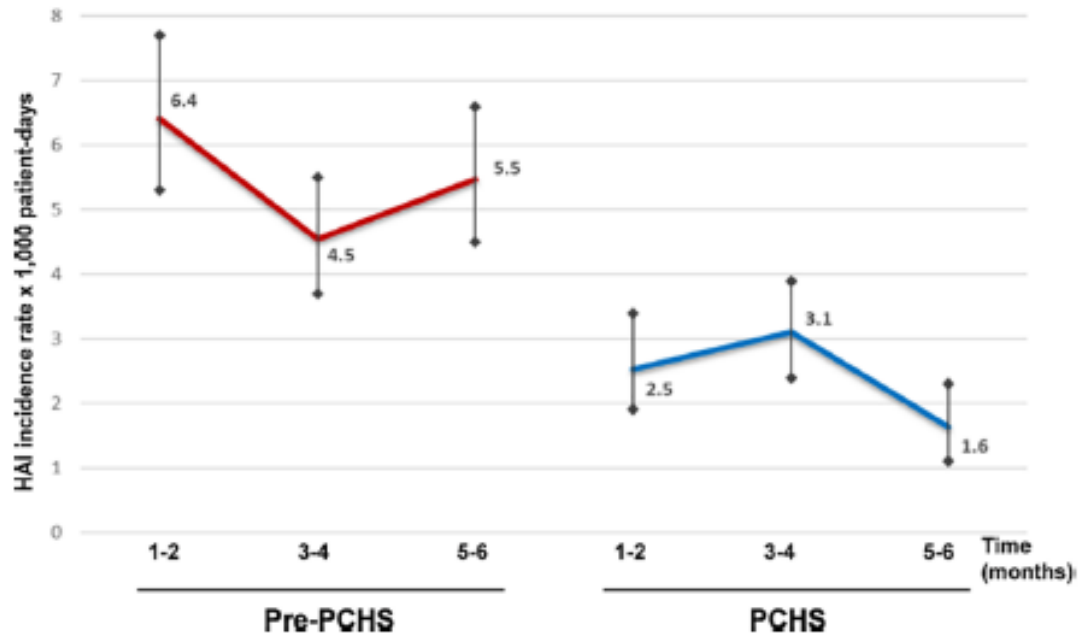


Tabelle 2. Patientenmerkmale in den Krankenhäusern I₁ und I₂ in der Prä-PCHS-Phase und PCHS-Phase (11.461 Patienten).

Patients characteristics	Pre-PCHS	PCHS
	Total patients No. (%)	Total patients No. (%)
Total	5,930	5,531
Gender: male	2,977 (50.2%)	2,928 (52.9%)
Age <65	1,518 (25.6%)	1,265 (22.9%)
Age 65–74	1,261 (21.3%)	1,177 (21.3%)
Age 75–84	1,821 (30.7%)	1,753 (31.7%)
Age ≥85	1,330 (22.4%)	1,336 (24.2%)
Incontinence	1,448 (24.4%)	1,369 (24.8%)
Disorientation	804 (13.6%)	747 (13.5%)
Self-sufficiency	3,671 (61.9%)	3,632 (65.7%)
Pressure sores	393 (6.6%)	237 (4.3%)
Surgery 30 day before	122 (2.1%)	80 (1.4%)
Ventilation	215 (3.6%)	161 (2.9%)
Parenteral nutrition	200 (3.4%)	141 (2.5%)
ATB 2 week before	566 (9.5%)	294 (5.3%)
MDRO at admission	131 (2.2%)	83 (1.5%)
Infection at admission	1,216 (20.5%)	1,089 (19.7%)
Urinary catheter (any type)	1,368 (23.1%)	1,166 (21.1%)
CVC	264 (4.5%)	260 (4.7%)

Selbstversorgung = Fähigkeit, für sich selbst zu sorgen, ermittelt mithilfe der SSM-Skala (*Self Sufficiency Matrix*, Selbstversorgungsmatrix); ATB = Antibiotika; MDRO = mehrfachresistente Organismen gegen Arzneimittel; CVC = Zentralvenenkatheter

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.t002>

Tabelle 3. HAI in der Prä-PCHS-Phase und PCHS-Phase, stratifiziert nach Art

No. of HAIs		Pre-PCHS (I ₁ + I ₂) No. (%)	PCHS (I ₁ + I ₂) No. (%)	1 st 6-months period ^{extC} No. (%)	2 nd 6-months period ^{extC} No. (%)
Type	Urinary tract infections-UTI	179 (57.0%)	70 (49.6%)	8 (53.3%)	6 (37.5%)
	Bloodstream infections-BSI [CVC related]	54 [10] (17.2%)	31 [7] (22.0%)	-	3 (18.8%)
	Clinical sepsis	22 (7.0%)	5 (3.5%)	1 (6.7%)	-
	Gastrointestinal-GI	17 (5.4%)	6 (4.3%)	2 (13.3%)	-
	Skin and soft tissue	15 (4.8%)	6 (4.3%)	3 (20.0%)	1 (6.2%)
	Pneumonia	12 (3.8%)	8 (5.7%)	-	2 (12.5%)
	Lower respiratory tract	10 (3.2%)	6 (4.3%)	-	3 (18.8%)
	Reproductive tract	1 (0.3%)	-	-	-
	Eye, ear, nose and throat or mouth EENT	1 (0.3%)	2 (1.4%)	-	-
	Bone and joint	-	1 (0.7%)	-	-
	Intra-abdominal	-	1 (0.7%)	-	-
	Surgical Site Infection	-	-	-	1 (6.2%)
	Not specified	3 (1.0%)	5 (3.5%)	1 (6.7%)	-

* 256 Patienten mit 1 HAI, 26 mit 2 HAI und 2 mit 3 HAI

° 115 Patienten mit 1 HAI und 13 mit 2 HAI

9 Patienten mit 1 HAI und 3 mit 2 HAI

§ 16 Patienten mit 1 HAI

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.t003>

Tabelle 4. Aus den HAI isolierte Mikroorganismen in der Prä-PCHS-Phase und PCHS-Phase in den Krankenhäusern I₁ und I₂

	Pre-PCHS	PCHS	
Infections*	301	135	
Exam not available or negative	27	19	
Exam available	274	116	
Isolated microorganisms	Samples (n,%)	Samples (n,%)	PCHS vs pre-PCHS
<i>S. aureus</i>	21 (6.3%)	16 (11.6%)	-23.8%
<i>Staphylococcus spp.</i>	30 (9.0%)	10 (7.2%)	-66.6%
<i>Enterococcus spp.</i>	57 (17.2%)	24 (17.5%)	-57.8%
<i>Streptococcus spp.</i>	7 (2.1%)	4 (2.9%)	-42.8%
<i>C. difficile</i>	9 (2.7%)	3 (2.2%)	-66.6%
<i>E. coli</i>	93 (28%)	27 (19.7%)	-70.9%
<i>Klebsiella spp.</i>	19 (5.7%)	12 (8.7%)	-36.8%
<i>P. mirabilis</i>	15 (4.5%)	6 (4.3%)	-60.0%
<i>P. aeruginosa</i>	15 (4.5%)	10 (7.2%)	-33.3%
<i>Enterobacter spp.</i>	8 (2.4%)	1 (0.7%)	-87.5%
<i>Citrobacter spp.</i>	3 (0.9%)	0	-100%
<i>A. baumannii</i>	8 (2.4%)	5 (3.6%)	-37.5%
<i>Morganella spp.</i>	3 (0.9%)	0	-100%
Other <i>Enterobacteriaceae</i>	1 (0.3%)	0	-100%
<i>Candida spp.</i>	26 (7.8%)	11 (8.0%)	-57.7%
Virus	5 (1.5%)	3 (2.1%)	-40.0%
Others	12 (3.6%)	5 (3.6%)	-58.3%
Total	332 (100%)	137 (100%)	-

* Während der Prä-PCHS-Phase schlossen 301 HAI 13 Koinfektionen ein; während der PCHS-Phase schlossen 135 HAI 6 Koinfektionen ein.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.t004>

Tabelle 5. Mit dem Auftreten einer HAI bei den Patienten in den Krankenhäusern I₁ und I₂ verbundene Risikofaktoren: multivariables Modell*.

Population characteristics	P	OR	95% CI
Male	0.01812	0.78	0.63–0.96
Age 65–74 vs Age <65	0.0047	1.71	1.18–2.48
Age 75–84 vs Age <65	0.0004	1.88	1.33–2.67
Age 85 or more vs Age <65	0.0026	1.78	1.22–2.58
Length of stay	p<0.0001	1.08	1.07–1.09
Incontinence	0.2253	0.85	0.66–1.10
Disorientation	0.0226	1.37	1.05–1.76
Self-sufficiency	0.5600	0.92	0.69–1.43
Pressure sores	0.9757	0.99	0.69–1.44
Ventilation	0.7702	1.07	0.68–1.67
ATB 2 week before	0.8479	0.97	0.68–1.37
MDRO at admission	0.6230	0.86	0.47–1.57
Urinary catheter (any type)	p<0.0001	2.68	2.10–3.41
CVC	0.0001	1.99	1.40–2.82
PCHS	p<0.0001	0.44	0.35–0.54

* Das multivariable Modell schloss alle Faktoren ein, welche gemäß der univariaten Analyse als auf signifikante Weise mit dem Auftreten von HAI verbunden erachtet wurden (11.461 Patienten).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.t005>

Auswirkung der Reinigung auf Mikrobiota auf den Oberflächen in den Krankenhäusern

Bei Analysen der Gesamtkeimzahl auf den Oberflächen, darunter der Nachweis und die quantitative Bestimmung von *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter*, *Clostridium difficile* und *Candida spp.*, konnte in allen teilnehmenden Stationen in der Prä-PCHS-Phase eine hartnäckige Kontamination mit einer Gesamtkeimzahl von 22.737 CFU/m² (Median, Bereich 17.053-60.632 CFU/m²) nachgewiesen werden, welche überwiegend der Kontamination durch *Staphylococcus spp.* zuzuschreiben ist (Median 21.895 CFU/m², Bereich 13.684-57.263 CFU/m²). Die anderen mikrobiellen Arten traten nicht so häufig auf: *Enterobacteriaceae* (Median 1.784 CFU/m², Bereich 444-3.015 CFU/m²), *Acinetobacter* (Mittelwert 2.538 CFU/m², Bereich 214-3.836 CFU/m²), *Pseudomonas spp.* (Mittelwert 361 CFU/m², Bereich 43-2.125 CFU/m²), *C. difficile* (Mittelwert 286 CFU/m², Bereich 137-842 CFU/m²) und *Candida spp.* (Mittelwert 1.480 CFU/m², Bereich 1.075-5.508 CFU/m²) (Dateien mit unterstützenden Informationen im Repository BioStudies, Zugriffsnummer S-BSST75).

Die Einführung des PCHS in den fünf Interventionskrankenhäusern (Gruppe I₁ und I₂) führte zu einem statistisch signifikanten Rückgang der Kontamination durch Krankheitserreger von 22.737 CFU/m² auf 4.632 CFU/m² (Median, Bereich 842-12.632 CFU/m²) (P<0,0001, entspricht einem mittleren Rückgang der Krankheitserregerzahl auf Oberflächen um 83%, Bereich 70-96,3%) (Abb. 3A). Im Gegensatz dazu wurden keine

Veränderungen zwischen den zwei Beobachtungsphasen beim externen Kontrollkrankenhaus festgestellt.

Gleichzeitig ist der Anteil von PCHS-*Bacilli* auf den Oberflächen der Interventionskrankenhäuser von 0% (Median, Bereich 0-30%) auf 69,8% (Median, Bereich 39,9-86,8%) der gesamten Mikrobiota auf Oberflächen ($P < 0,0001$) stark gestiegen (Abb. 3B). Im Kontrollkrankenhaus_{extC} wurde keine Erhöhung der *Bacillus*-Zahl festgestellt.

Eine Microarray-Analyse des Resistoms der Mikrobiota belegte allgemein einen erheblichen Rückgang der Resistenzgene in den Krankenhäusern I_1 und I_2 während der PCHS-Phase im Vergleich zu der nachgewiesenen Anzahl in der Prä-PCHS-Phase ($P < 0,0001$; $P_c = 0,008$) (S1-Abb.) (Dateien mit unterstützenden Informationen im Repository BioStudies, Zugriffsnummer S-BSST75). Die Prävalenz von R-Genen fiel in den einzelnen Krankenhäusern unterschiedlich aus und spiegelt vermutlich den in jeder Umgebung ausgeübten selektiven Druck wider, allerdings wurde ein Rückgang von ursprünglich vorhandenen R-Genen während der Prä-PCHS-Phase in allen Krankenhäusern beobachtet. Im Unterschied dazu wurde kein Rückgang im externen Kontrollkrankenhaus verzeichnet.

Zeitgleich ergab eine Resistom-Microarray-Analyse von PCHS-*Bacilli*-Isolaten von den Oberflächen der Interventionskrankenhäuser bei allen während der gesamten Studie untersuchten Isolaten, dass keine R-Gene erworben worden waren (Abb. 4), was die Erkenntnisse früherer Studien bestätigte, welche eine genetische Stabilität der PCHS-*Bacillus*-Stämme nahelegten.

Erörterung

Die Rolle einer hartnäckigen Kontamination der Oberflächen bei der Übertragung von HAI ist anerkannt [6, 8-11], allerdings fehlt es an robusten Daten über die Auswirkung eines umweltverträglichen Reinigungsverfahrens auf die HAI-Inzidenz, da bis dato die meisten Studien, welche die Gesamtkeimzahl in der Umgebung mit der HAI-Inzidenz korrelierten, eine Reihe von Faktoren berücksichtigten oder auf konkrete Stationen (z. B. Intensivstation) beschränkt waren [32, 33].

Da wir vor kurzem darüber berichteten, dass Reinigungsverfahren mit probiotischen Produkten (PCHS) die Mikrobiota auf Oberflächen in Krankenhäusern verändern können [27, 29], sollte durch diese Interventionsstudie im Prä-Post-Design die unmittelbar mögliche Auswirkung dieses Systems auf die HAI-Inzidenz untersucht werden.

Ohne dass weitere ICP-Maßnahmen umgesetzt wurden, legen unsere Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen dem PCHS und einer erheblichen Verringerung ($P < 0,0001$) der HAI-Inzidenz auf den Stationen von Akutkrankenhäusern nahe.

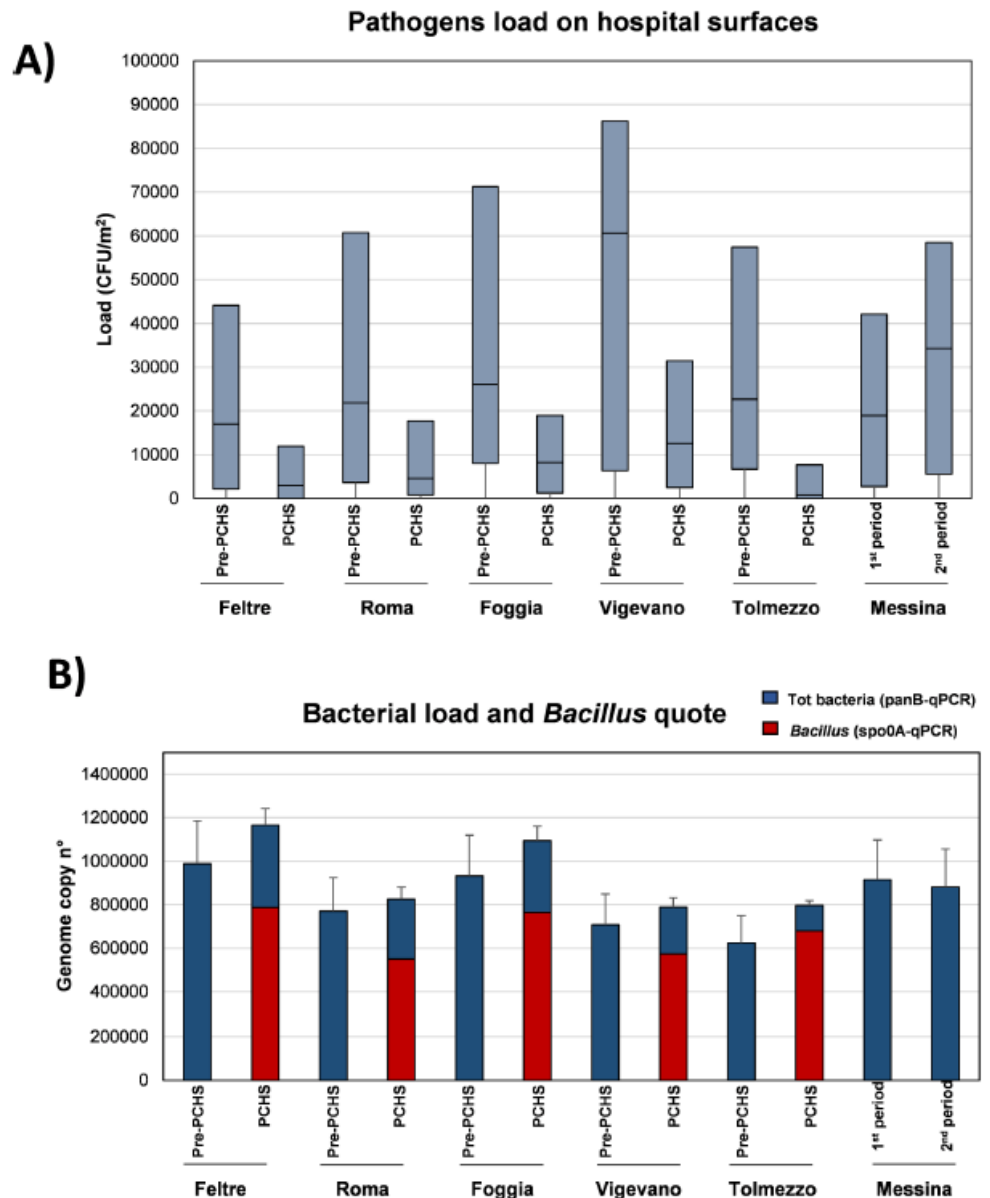


Abb. 3. Kontamination der Oberflächen in den untersuchten Krankenhäusern. (A) Zahl von Krankheitserregern auf den Oberflächen in den Krankenhäusern, angegeben in CFU/m². Die Anzahl von sechs Krankheitserregern wurde durch eine direkte CFU-Zählung auf speziellen Rodac-Platten, wie in den Methoden beschrieben, ermittelt (*Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Candida spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.*). Die grafisch dargestellten Ergebnisse entsprechen der Summe der für jeden untersuchten Krankheitserreger erhaltenen Mediane. Die Mediane (unterer Teil des Balkens) und Q3-Werte (oberer Teil des Balkens, welcher die 75%igen Perzentilwerte darstellt) werden für jedes Krankenhaus für die Präinterventionsphase (Prä-PCHS) und die Interventionsphase (PCHS) aufgeführt. Die vom externen Kontrollkrankenhaus (Messina) erhaltenen Werte entsprechen den im ersten und im zweiten sechsmonatigen Zeitraum der Studie ermittelten Werten. (B) Gesamtbakterienzahl und Anzahl von PCHS-*Bacilli*, ermittelt durch einen pan-bakteriellen qPCR (*panB*) und einen speziellen qPCR für *Bacillus*-Arten (*spo0A*). Die Ergebnisse sind in der Anzahl von Kopien des Genoms pro 100 ng getesteter DNS angegeben. Die Mediane ± Standardabweichung (SD) für die Prä-PCHS- und PCHS-Phase sind aufgeführt. Außerdem erscheinen die Werte für das externe Kontrollkrankenhaus (Messina), welche den in der ersten bzw. zweiten 6-monatigen Phase der Studie festgestellten Werten entsprechen.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.g003>

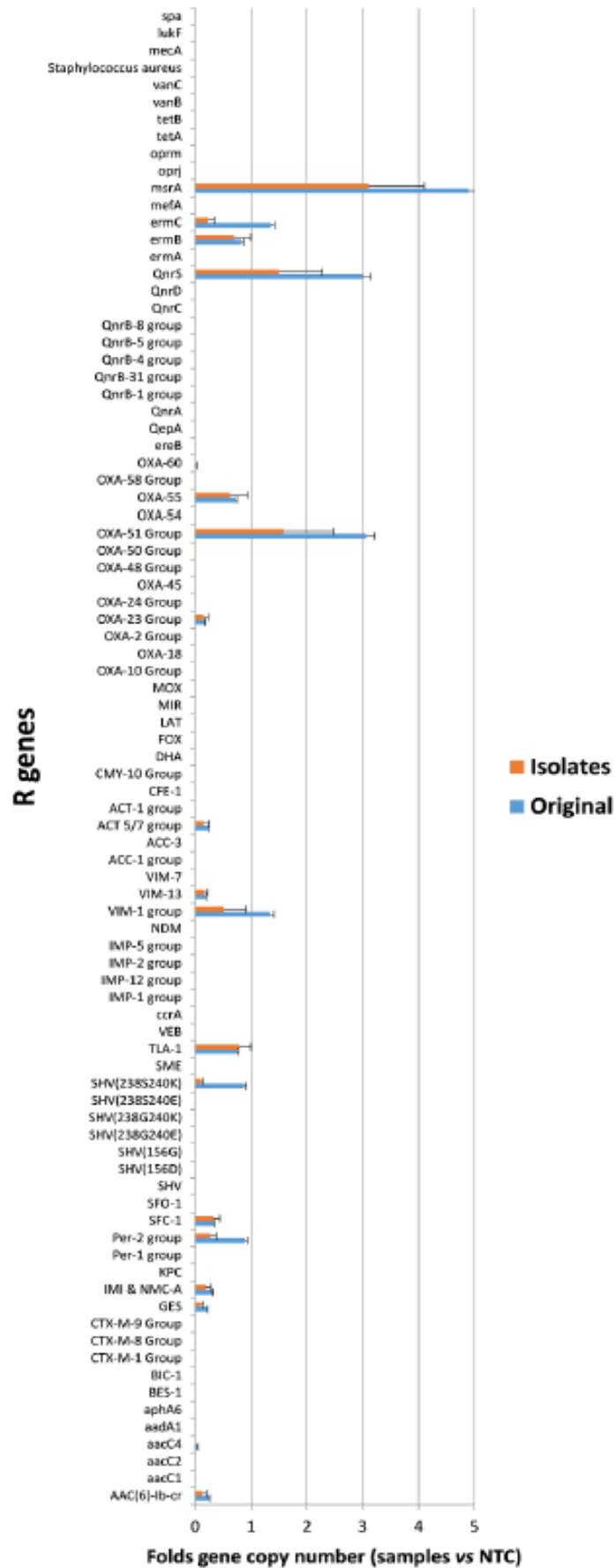


Abb. 4. Resistomanalyse der PCHS-*Bacillus*-Stämme. Die Antibiotikaresistenzgene wurden im Microarray im PCHS-Produkt vor der Anwendung - enthielt eine Mischung aus drei *Bacillus*-Arten (Original) - und in den *Bacillus*-Isolaten (Isolate) analysiert, die von den Oberflächen in den Krankenhäusern I₁ und I₂ in der PCHS-Phase genommen wurden. Im Hinblick auf die originalen PCHS-*Bacilli* wurden die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung der sechs Parallelproben angegeben. Was die Isolate betrifft, wurden die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung der 120 von den Oberflächen in den Krankenhäusern isolierten *Bacilli* angegeben. Die Werte der Originale und Isolate wurden mit negativen Kontrollwerten (NTC) verglichen. Jedes *Bacillus*-Isolat wurde im Rahmen einer PCR identifiziert und vor der Microarray-Analyse sequenziert, wie zuvor beschrieben [29].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616.g004>

Die Verringerung wurde bei allen HAI festgestellt, die am häufigsten auf den Stationen für innere Medizin nachgewiesen werden, wobei einige von ihnen mit einer Übertragung durch Kontakt in Verbindung gebracht werden. Damit einher ging zeitgleich eine Verringerung der verantwortlichen isolierten Mikroorganismen; ihre relative Häufigkeit blieb jedoch unverändert.

Während die multivariable Analyse die Rolle wohlbekannter Risikofaktoren [34], wie das Vorliegen von Kathetern (OR = 2,68 für Blasenkatheter und OR = 1,99 für Zentralvenenkatheter) bestätigte, konnte ferner nachgewiesen werden, dass PCHS ein unabhängiger Schutzfaktor (OR = 0,44; KI 95%, 0,35-0,54) ($P < 0,0001$) ist.

Außerdem bestätigten die Daten über die Gesamtkeimzahl in einer großen Stichprobe, dass PCHS in der Lage ist, die Kontamination einer Umgebung zu verringern und zu verändern. So führte es zu einem erheblichen Rückgang (-83%) der Gesamtkrankheitserregerzahl auf Oberflächen sowie der Resistenzgene (bis zu 2 Logs), die in den Mikrobiota auf den Oberflächen zu finden sind [27-29]. Dies legt nahe, dass probiotische *Bacilli* vorab bestehende Krankheitserreger verdrängen und ersetzen sowie auf diese Weise die Besiedlung und Verbreitung neuer möglicherweise pathogener und arzneimittelbeständiger Erreger einschränken können (Kontamination von Pflegern, neuen Patienten und Gesundheitsfachkräften), was ein in der Natur wohlbekannter Wettbewerbsmechanismus ist [35-38].

Zudem bestätigt die mikrobiologische und molekulare systematische Kontrolle im Rahmen dieser Studie die sichere Anwendung des PCHS, welche bereits in früheren Studien beobachtet wurde [26, 27, 39]. Dies bestätigt zudem die genetische Stabilität der PCHS-*Bacilli* und die Abwesenheit eines Infektionsrisikos in Verbindung mit dem Einsatz von PCHS-Probiotika in Krankenhausumgebungen.

Einschränkungen

Wenngleich diese Studie eine starke Schutzwirkung von PCHS nahelegt, unterliegt sie gewissen Einschränkungen. Eine erste mögliche Einschränkung ergibt sich aus dem Studiendesign, welches einen Vergleich vor und nach der Intervention in denselben Krankenhäusern

vorsieht. Ungeachtet dessen weisen die Stichprobengröße und das Ausmaß der sich ergebenden Verringerung auf einen eindeutigen Nutzen des PCHS hin. Auf Grundlage dieser Ergebnisse könnten Weiterentwicklungen Studien mit größeren Stichproben und verschiedenen Methoden umfassen, wie Studien im Stepped-Wedge-Design und/oder Cluster-randomisierte Studien, einschließlich der Kosteneffizienz. Zudem war die Anzahl von externen Kontrollkrankenhäusern klein, sodass mitunter keine erhebliche Verringerung aufgrund dieser Einschränkung beobachtet werden konnte. Da die untersuchten Umgebungen auf die Stationen für innere Medizin, Geriatrie und Neurologie beschränkt waren, würden künftige Studien von der Untersuchung der Auswirkung in anderen Krankenhausumgebungen und Pflegebereichen profitieren, um die Verallgemeinerbarkeit der erhaltenen Ergebnisse besser zu verstehen. Eine weitere Einschränkung ist darauf zurückzuführen, dass die Stichprobengröße zum Nachweis von Differenzen in der gesamten Stichprobe und nicht in den jeweiligen Krankenhäusern berechnet wurde; ungeachtet dessen belegen die Ergebnisse einen HAI-Rückgang in allen Krankenhäusern, wenngleich dieser in den Krankenhäusern mit einer niedrigen HAI-Ausgangsinzidenz nicht statistisch signifikant war. Eine dritte Einschränkung ergibt sich aus der möglichen Voreingenommenheit, da die Gesundheitsfachkräfte Kenntnis von der Studie hatten. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die Gesundheitsfachkräfte nur darüber unterrichtet wurden, dass eine Inzidenzstudie während des Studienzeitraums (18 Monate) durchgeführt wird. Zudem wurde diesem Bedenken entgegengewirkt, indem die Auskünfte exklusiv auf die Krankenhausleitung und die für die Rekrutierung, externe Datenerfassung und Datenextraktion verantwortlichen Personen beschränkt wurden und ein externes Kontrollkrankenhaus eingeschlossen wurde, um eine mögliche Auswirkung, die auf die reine Präsenz einer Studie zurückzuführen ist, zu überwachen. Gleichzeitig ist zu bedenken, dass die Studiendauer sehr lang war (insgesamt über einen Zeitraum von 18 Monaten), was die mögliche Voreingenommenheit und das Augenmerk der Teams aus Gesundheitsfachkräften einschränken dürfte. Eine weitere mögliche Verzerrung könnte sich aus der Saisonalität und der räumlichen Verteilung der eingeschlossenen Krankenhäuser ergeben. Der 6-monatige Nachbeobachtungszeitraum könnte nicht ausreichend sein, um die Auswirkungen saisonaler Schwankungen aufzuheben und daher könnte dieser Mangel an eingeschlossenen Prüfzentren aus den drei Regionen in die Gruppe I_1 und I_2 eine Einschränkung darstellen. Künftige Studien könnten daher eine längere Nachbeobachtungsphase und/oder einen robusteren Einschluss vorsehen. Unbeschadet dessen scheinen das Ausmaß und die Charakteristika der HAI-Verringerung sowie die relative Wirkung im Hinblick auf die Vertreibung der Mikrobiota darauf hinzudeuten, dass diese möglichen Störfaktoren, soweit sie vorliegen sollten, eine einschränkende Wirkung haben könnten.

Wenngleich vereinbart wurde, keine Maßnahmen einzuführen, um die Infektionskontrolle in den eingeschlossenen Krankenhäusern zu verbessern, besteht ein Störpotenzial durch die mangelhafte Feststellung der Handhygiene während des Studienzeitraums.

Fazit

Dies ist unserem Wissen nach die erste Studie, die einen Zusammenhang zwischen der HAI-Inzidenz und Umgebungsmikrobiota in einer solch großen Stichprobe belegt. Insgesamt können die erhaltenen Ergebnisse möglicherweise dazu beitragen, die Rolle der Veränderung von Umgebungsmikrobiota für Reinigungsverfahren in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen und Pflegeeinrichtungen in den Vordergrund zu rücken, sodass die Möglichkeit zur Einführung eines ökologischen Ansatzes im Bereich der umweltfreundlichen Reinigung besteht, welche in die wirksamen Instrumente zur Infektionsprävention und -eindämmung (IPC) aufgenommen werden könnte. Dies könnte Maßnahmen begünstigen, die darauf abzielen, die Bildung einer mikrobiellen Resistenz gegen Desinfektionsmittel und Antibiotika zu verringern, was eine wirksame Kostensenkung im Hinblick auf das HAI-Management mit sich bringen würde. Andererseits könnten unsere Ergebnisse bei der Einführung von Methoden zur Untersuchung der Gesamtkeimzahl in der Umgebung und der Verbreitung des Resistoms in den medizinischen Einrichtungen und Pflegeeinrichtungen nützlich sein, da ihre systematische Analyse die Möglichkeit zur Untersuchung neuer Strategien für die Eindämmung ihrer Verbreitung eröffnen könnte. Abschließend ist zu erwähnen, dass diese Studie neue Forschungsfragen aufwirft: die Anwendbarkeit und Auswirkung in unterschiedlichen Umgebungen, die Auswirkung auf unterschiedliche HAI-Arten, die langfristige Wirkung einer routinemäßigen Anwendung des PCHS, die Dynamik zwischen der menschlichen Krankheitserregerpopulation und den probiotischen *Bacilli* sowie die Auswirkung auf die Kosten in Verbindung mit dem HAI-Management. Natürlich wird es gründlicherer Analysen über die Kosteneffizienz sowie künftiger Studien mit optimalem Design bedürfen, um die in dieser Studie noch fehlenden Informationen zu erörtern.

Kurz gesagt könnten diese Ergebnisse von Bedeutung sein, um die Rolle der Umgebungsmikrobiota in medizinischen Einrichtungen und Pflegeeinrichtungen besser zu verstehen, was der Erarbeitung von Richtlinien für umweltfreundliche Reinigungsverfahren, die einer Optimierung der IPC-Strategie dienen, förderlich sein könnte.

Unterstützende Informationen

S1-Tabelle. HAI-Frequenz im Verhältnis zu den Charakteristika der Patienten in den Krankenhäusern I₁ und I₂. Die Ergebnisse aus der univariaten Analyse erläutern die Risikofaktoren für den Eintritt einer HAI bei den Prä-PCHS- und PCHS-Patienten (DOCX).

S1-Abb. Resistomanalyse der Mikrobiota auf Oberflächen. (A) Analyse der Antibiotikaresistenzgene in der gesamten bakteriellen Population auf den Oberflächen in den fünf Interventionskrankenhäusern (Krankenhäuser I₁ und I₂) in der Prä-PCHS- und PCHS-Phase der Studie. Die Ergebnisse werden als mittlere Faltenveränderungen \pm SD im Vergleich zu den negativen Kontrollwerten (für die Prä-PCHS-Phase) und zu den Prä-PCHS-Werten (für die PCHS-Phase) angegeben. (b) Analyse auf Antibiotikaresistenzgene in den gesamten Mikrobiota auf den Oberflächen des externen Kontrollkrankenhauses (_{ext}C) im ersten und zweiten 6-monatigen Studienzeitraum. Die Ergebnisse aus dem ersten Zeitraum werden als mittlere Faltenveränderungen \pm SD im Vergleich zu den negativen Kontrollwerten (NTC) angegeben, die Ergebnisse aus dem zweiten Zeitraum werden als Mittelwerte \pm SD im Vergleich zu den Werten aus dem ersten Zeitraum angegeben, was dem Verfahren für die Prä-PCHS- und PCHS-Phase in den Interventionskrankenhäusern ähnelt. (TIF)

Danksagung

Die SAN-ICA-Studiengruppe besteht aus: Maria D'Accolti, Micol Piffanelli, Irene Soffritti, Luca Lanzoni, Matteo Bisi, Antonella Volta, Maria Teresa Camerada, Piergiorgio Balboni, Carla Rognoni, Antonella Mastretti, Francesca Campanella, Paolo Grotto, Francesca Trozzi und Ermelinda Del Buono. Wir möchten uns an dieser Stelle beim gesamten Personal aller teilnehmenden Krankenhäuser für ihre fachliche Unterstützung bedanken.

Autorenbeiträge

Entwicklung eines Konzepts: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Paola Antonioli, Sante Mazzacane

Datenpflege: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Maddalena Coccagna, Luca Arnoldo, Filippo Berloco, Paola Antonioli, Rosanna Tarricone, Gabriele Pelissero, Silvano Nola, Vincenza La Fauci, Alessandro Conte, Lorenzo Tognon, Giovanni Villone, Nelso Trua und Sante Mazzacane

Formelle Analyse: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Maddalena Coccagna, Luca Arnoldo, Rosanna Tarricone und Sante Mazzacane

Mittelbeschaffung: Sante Mazzacane

Untersuchung: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Maddalena Coccagna, Luca Arnoldo, Filippo Berloco, Paola Antonioli, Rosanna Tarricone, Gabriele Pelissero, Silvano Nola, Vincenza La Fauci, Alessandro Conte, Lorenzo Tognon, Giovanni Villone, Nelso Trua und Sante Mazzacane

Methoden: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Maddalena Coccagna, Rosanna Tarricone und Sante Mazzacane

Projektmanagement: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Maddalena Coccagna, Luca Arnoldo, Filippo Berloco, Paola Antonioli, Rosanna Tarricone, Gabriele Pelissero, Silvano Nola, Vincenza La Fauci, Alessandro Conte, Lorenzo Tognon, Giovanni Villone, Nelso Trua und Sante Mazzacane

Ressourcen: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Maddalena Coccagna, Luca Arnoldo, Filippo Berloco, Paola Antonioli, Rosanna Tarricone, Gabriele Pelissero, Silvano Nola, Vincenza La Fauci, Alessandro Conte, Lorenzo Tognon, Giovanni Villone, Nelso Trua und Sante Mazzacane

Software: Maddalena Coccagna, Luca Arnoldo und Sante Mazzacane

Aufsicht: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro und Sante Mazzacane

Validierung: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro und Sante Mazzacane

Visualisierung: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro und Sante Mazzacane

Verfassen - ursprünglicher Entwurf: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Rosanna Tarricone und Sante Mazzacane

Verfassen - Lektorat und redaktionelle Bearbeitung: Elisabetta Caselli, Silvio Brusafarro, Maddalena Coccagna, Luca Arnoldo, Filippo Berloco, Paola Antonioli, Rosanna Tarricone, Gabriele Pelissero, Silvano Nola, Vincenza La Fauci, Alessandro Conte, Lorenzo Tognon, Giovanni Villone, Nelso Trua und Sante Mazzacane

Quellenangabe

1. Allegranzi B., Bagheri Nejad S., Combescure C., Graafmans W. Attar H., Donaldson L. et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011; 377(9761):228-41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61458-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61458-4) PMID: 21146207
2. Suetens C., Hopkins S., Kolman J., Diaz Högberg L. Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm, Schweden. Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten, 1. Juli 2013 [zitiert: 29. Mai 2018]. In: ECDC Surveillance Report [www.ecdc.europa.eu]. Abrufbar unter: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>

3. Mancini A., Verdini D., La Vigna G, Recanatini C., Lombardi FE., Barocci S. Retrospective analysis of nosocomial infections in an Italian tertiary care hospital. *New Microbiol.* 2016; 39(3).
4. Capozzi C., Capozzi A., Visconti G., Ignisti F., Panà A. Mastrobuono I. Le infezioni ospedaliere: elementi di epidemiologia e prevenzione. *Organizzazione Sanitaria.* 2004; 3(4):3-26.
5. Messineo A., Marsella LT. Biological hazards and healthcare-associated infections in Italian healthcare facilities: some considerations on inspections and accountability. *Ann Ig.* 2015; 27(6):799-807. <https://doi.org/10.7416/ai.2015.2073> PMID: 26835794
6. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J. Hosp. Infect.* 2007; 65 Suppl. 2:50-4.
7. Mitchell BG., Dancer SJ., Anderson M., Dehn E. Risk of organism acquisition from prior room occupants: a systematic review and meta-analysis. *J. Hosp. Infect.* 2015; 91(3):211-7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.08.005> PMID: 26365827
8. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39(8):1182-9. <https://doi.org/10.1086/424667> PMID: 15486843
9. Dancer SJ: Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(4):665-90. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-14> PMID: 25278571
10. Otter JA., Yezli S., French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2011; 32(7):687-99. <https://doi.org/10.1086/660363> PMID: 21666400
11. Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J. Hosp. Infect.* 2009; 73(4):378-85. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.030> PMID: 19726106
12. Weber DJ., Anderson D., Rutala WA. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013; 26(4):338-44. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283630f04> PMID: 23743816
13. Weber DJ., Rutala WA. Role of environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant enterococci. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1997; 18(5):306-9. PMID: 9154471
14. Kramer A., Schwebke I., Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect. Dis.* 2006; 6:130. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130> PMID: 16914034
15. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K., Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am. J. Infect. Control.* 2010; 38(5 Suppl. 1):S25-33.
16. Goodman ER., Platt R., Bass R., Onderdonk AB., Yokoe DS., Huang SS. Impact of an environmental cleaning intervention on the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on surfaces in intensive care unit rooms. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2008; 29(7):593-9. <https://doi.org/10.1086/588566> PMID: 18624666

17. Carling PC., Parry MF., Bruno-Murtha LA., Dick B. Improving environmental hygiene in 27 intensive care units to decrease multidrug-resistant bacterial transmission. *Crit. Care Med.* 2010; 38(4):1054-9. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181cdf705> PMID: 20081531
18. Rutala WA., Weber DJ. Selection of the ideal disinfectant. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2014; 35(7):855-65. <https://doi.org/10.1086/676877> PMID: 24915214
19. Almatroudi A., Gosbell IB. Hu H., Jensen SO., Espedido BA., Tahir S. et al. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. *J. Hosp. Infect.* 2016; 93(3):263-70. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.03.020> PMID: 27140421
20. Bock LJ., Wand ME., Sutton JM. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and adapted strains. *J. Hosp. Infect.* 2016; 93(1):42-8. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.12.019> PMID: 26899354
21. Wand ME., Bock LJ., Bonney LC., Sutton JM. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(1)
22. Cornejo-Juarez P., Vilar-Compte D., Perez-Jimenez C., Namendys-Silva SA., Sandoval-Hernandez S., Volkow-Fernandez P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 31:31-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.12.022> PMID: 25528484
23. Caini S., Hajdu A., Kurcz A., Borocz K. Hospital-acquired infections due to multidrug-resistant organisms in Hungary, 2005-2010. *Euro. Surveill.* 2013; 18(2).
24. Pettigrew MM., Johnson JK., Harris AD. The human microbiota: novel targets for hospital-acquired infections and antibiotic resistance. *Ann. Epidemiol.* 2016; 26(5):342-7. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2016.02.007> PMID: 26994507
25. Al-Ghalith GA., Knights D. Bygiene: the new paradigm of bidirectional hygiene. *Yale J. Biol. Med.* 2015; 88(4):359-65. PMID: 26604859
26. Caselli E., Antonioli P., Mazzacane S. Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation. *J. Hosp. Infect.* 2016; 94(2):193-4. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.06.021> PMID: 27436618
27. Vandini A., Temmerman R., Frabetti A., Caselli E., Antonioli P., Balboni PG et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS One.* 2014; 9(9):e108598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108598> PMID: 25259528
28. La Fauci V., Costa GB., Anastasi F., Facciola A., GO C., Squeri R. An innovative approach to hospital sanitization using probiotics: *in vitro* and field trials. *Microbial & Biochemical Technology.* 2015; 7(3):5.
29. Caselli E., D'Accolti M., Vandini A., Lanzoni L., Camerada MT., Coccagna M. et al. Impact of a probiotic-based cleaning intervention on the microbiota ecosystem of the hospital surfaces: focus on the

- resistome remodulation. PLoS One. 2016; 11(2):e0148857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148857> PMID: 26886448
30. Caselli E. Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings. Microb. Biotechnol. 2017; 10(5):1079-83. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12755> PMID: 28677216
31. ECDC. European surveillance of healthcare associated infections in intensive care units. HAI-Net ICU protocol version 1.02. 18. März 2015 [zitiert: 29. Mai 2018] In: Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten, Publikation & Daten [www.ecdc.europa.eu]. Abrufbar unter: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-surveillance-healthcare-associated-infections-intensive-care-units-hai>
32. Donskey CJ. Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections? Am. J. Infect. Control. 2013; 41(5 Suppl.):S12-9.
33. Hall L., Farrington A., Mitchell BG., Barnett AG., Halton K., Allen M. et al. Researching effective approaches to cleaning in hospitals: protocol of the REACH study, a multi-site stepped-wedge randomised trial. Implement. Sci. 2016; 11:44. <https://doi.org/10.1186/s13012-016-0406-6> PMID: 27009342
34. Rodriguez-Acelas AL., de Abreu Almeida M., Engelman B., Canon-Montanez W. Risk factors for health care-associated infection in hospitalized adults: systematic review and meta-analysis. Am. J. Infect. Control. 2017
35. Ilinskaya ON., Ulyanova VV., Yarullina DR., Gataullin IG. Secretome of intestinal *Bacilli*: a natural guard against pathologies. Front. Microbiol. 2017; 8:1666. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01666> PMID: 28919884
36. Wu L., Wu HJ., Qiao J., Gao X., Borriss R. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. Front. Microbiol. 2015; 6:1395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395> PMID: 26696998
37. Elshaghabe FMF., Rokana N., Gulhane RD., Sharma C., Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns and future perspectives. Front. Microbiol. 2017; 8:1490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490> PMID: 28848511
38. McFarland LV. Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. BMJ Open. 2014; 4(8):e005047. <https://doi.org/10.1136/bmjopen.2014-005047> PMID: 25157183
39. Caselli E., D'Accolti M., Soffritti I., Zatelli MC., Rossi R., Degli Uberti E. et al. HHV-6A in vitro infection of thyrocytes and T cells alters the expression of miRNA associated to autoimmune thyroiditis, Virol. J. 2017; 14(1):3. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0672-6> PMID: 28081700