

OGGETTO: Attività antibatterica contro *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA) del POP Polimero Ossigenato Plastificato (PVC), Pure-Health™, di Orion srl

INTRODUZIONE

Prof. Stefano Petti, DMD Full Professor Head of the Dental Section Sanarelli Building Piazzale Aldo Moro 5; 00185 Rome, Italy Tel/Fax: +3906 4991 4667 Email: stefano.petti@uniroma1.it

OGGETTO: Attività antibatterica contro *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA) del POP Polimero Ossigenato Plastificato (PVC), Pure-Health™, di Orion srl

Il ruolo dell'ambiente nella trasmissione delle infezioni contratte in ospedale.

Le superfici contaminate giocano un ruolo importante nella trasmissione di alcuni agenti patogeni responsabili delle infezioni contratte in ospedale (HAI).

Infatti, il *Clostridium difficile*, lo *Stafilococco aureus* resistente alla meticillina, l'enterococco resistente alla vancomicina, i norovirus e le colonie batteriche gram negative resistenti ai farmaci come l'*Acinetobacter baumannii* e la *Klebsiella pneumoniae*, condividono la capacità di staccarsi dalla pelle del personale o dai pazienti infetti o colonizzati, e di sopravvivere sulle superfici per lunghi periodi. Inoltre, questi sono difficili da debellare sia con la pulizia che con la disinfezione (Otter et al., 2013; Weber and Rutala, 2013). In generale, la persistenza di questi agenti patogeni sulle superfici ambientali è particolarmente alta. (**Table 1**) (Kramer et al., 2006).

Tavola 1. Persistenza stimata sulle superfici dei microrganismi responsabili delle infezioni contratte in ospedale.

Microorganismo	Persistence
<i>Clostridium difficile</i> (spore)	5 mesi
<i>Staphylococcus aureus</i> , i MRSA incluso	7 giorni – 7 mesi
<i>Enterococcus</i> spp. VRE incluso	5 giorni – 4 mesi
<i>Acinetobacter</i> spp.	3 giorni – 5 mesi
<i>Klebsiella</i> spp.	2 ore – 30 mesi
<i>Escherichia coli</i>	1.5 ore – 16 mesi
Norovirus and Calicivirus	8 ore – 7 giorni

Il trasferimento di agenti patogeni da un paziente infetto/colonizzato a un ospite propenso, di solito avviene attraverso le mani del personale medico. Tuttavia, le superfici degli ospedali contaminate sono anch'esse coinvolte come vie di trasmissione. Infatti, le mani e i guanti del personale medico possono contaminarsi venendo a contatto con le superfici contaminate le quali, a loro volta, erano state precedentemente contaminate da pazienti colonizzati o infetti o da altro personale medico.

Il ruolo delle superfici ambientali nella trasmissione delle malattie contratte in ospedale è provato da diversi elementi (Table2), che dimostrano la solidità della prova scientifica. (Otter et al., 2013; Weber and Rutala, 2013).

Tabella 2: Elementi che sostengono il ruolo delle superfici dell'ambiente contaminate nella trasmissione delle infezioni contratte in ospedale

1	Le superfici nelle stanze dei pazienti contaminati o colonizzati sono spesso contaminate da agenti patogeni
2	I patogeni sono in grado di sopravvivere sulle superfici degli ospedali per un prolungato periodo di tempo
3	Il contatto con le superfici ospedaliere da parte del personale medico porta spesso ad una contaminazione delle mani e/o dei guanti
4	La frequenza con la quale le superfici vengono contaminate è in correlazione alla frequenza della contaminazione delle mani e/o dei guanti del personale medico.
5	È stato dimostrato che la diffusione clonale dei patogeni che contaminano le superfici dei pazienti colonizzati o infetti è dovuta alla trasmissione da persona a persona.
6	Il paziente accolto in una stanza che era stata precedentemente occupata da un paziente colonizzato o infetto da un patogeno, ha maggiori probabilità di sviluppare infezione o colonizzazione da parte dello stesso patogeno.
7	Un'accurata pulizia finale delle stanze fa diminuire il rischio di infezione
8	Un'accurata disinfezione finale delle stanze fa diminuire il rischio di infezione nei pazienti che sono accolti nella stessa stanza che precedentemente era occupata da un paziente infetto o colonizzato.

Stafilococco aureus resistente alla meticillina (MRSA)

Lo MRSA è stato isolato per la prima volta nel 1961, nel Regno Unito, solo due anni dopo l'introduzione della meticillina nella pratica clinica. I Cloni di MRSA sparsi per il mondo e l'MRSA associato agli ospedali è il responsabile della maggior parte delle infezioni nosocomiali.

Le infezioni da stafilococco aureus resistente alla meticillina contratto negli ospedali (d'ora in poi AH-MRSA) si stimano interessare ogni anno circa 150 mila pazienti dell'Unione Europea e quasi 400 mila pazienti negli Stati Uniti con una conseguente spesa da parte del sistema sanitario di 380 milioni di euro in Europa e 14.5 miliardi di dollari negli Stati Uniti (Petti and Polimeni, 2011).

Come già anticipato, il ruolo delle superfici ambientali nella trasmissione di infezioni HA-MRSA è confermato da numerose prove. (Dancer, 2008). Per esempio, uno studio condotto in un reparto di terapia intensiva ha dimostrato come fosse assolutamente dimostrabile che, tra i pazienti che erano stati colonizzati/infettati dallo MRSA durante l'ospedalizzazione, l' 11,5 % degli stessi avesse contratto lo MRSA dall'ambiente contaminato (Hardy et al., 2006).

Tra le cause della trasmissione, c'è sicuramente la capacità dello MRSA di sopravvivere in un ambiente secco. Infatti, i ceppi dello MRSA sono in grado di sopravvivere su superfici lisce per almeno quattro mesi in ambienti dove l'umidità sia relativamente bassa (23-47%). (Petti et al., 2012).

Studi che hanno provato a controllare le infezioni da MRSA intensificando la pulizia delle superfici, hanno riportato un calo nei tassi d'incidenza dal 3% all'1.5% in un reparto di terapia intensiva (Datta et al., 2011) e dal 3.5% allo 0.5% in un reparto di chirurgia (Rampling et al., 2001). Questi ottimi risultati però contrastano parzialmente con degli studi cross-over, che hanno mostrato invece risultati contrastanti. Per esempio, da un lato, uno studio portato avanti in due reparti differenti dello stesso ospedale ha riportato come, grazie ad una pulizia più accurata, il numero di infezioni HA-MRSA fosse sceso da nove a quattro (Dancer et al., 2009); dall'altro lato però, uno studio diverso, condotto in due ospedali, ha riscontrato che, sebbene fossero state applicate le stesse misure, il numero di infezioni era invece salito da sette a nove. (Wilson et al., 2011).

Altre misure di controllo ambientale invece, come il sistema di sterilizzazione Xenon UV pulsata (Simmons et al., 2013) e il vapore di perossido di idrogeno (Mitchell et al., 2014), sono state in grado di dimezzare l'incidenza delle infezioni.

Una strategia di decontaminazione delle superfici alternativa è l'uso di una sottile pellicola di copertura (coating) dalle proprietà fotocatalitiche che consentono la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). La produzione di ROS da parte del biossido di titanio, con formula TiO_2 , è indotta dall'assorbimento di fotoni ad alta energia e dalla successiva eccitazione degli elettroni. Durante la fotoeccitazione, vengono prodotti dall'acqua radicali altamente reattivi, idrossile (OH), superossido (O_2) e il perossido d'idrogeno (H_2O_2). Questi elementi uccidono i microrganismi sia sulla superficie e fino a 50 μm di distanza dalla superficie. L'attività antibatterica del biossido di titanio fotoattivato è dovuta sostanzialmente al danneggiamento della membrana e della parete cellulare. La lista di batteri, funghi, protozoi, alghe e virus che possono essere uccisi dal biossido di titanio foto attivato è infinita. I nano cristalli di anatasio si sono dimostrati essere la forma più potente di biossido di titanio nella produzione di ROS. (Foster et al., 2011; Joost et al., 2015).

In un ospedale universitario, uno studio ha voluto che alcune superfici fossero ricoperte con pellicola di nano cristalli di TiO_2 . Nelle aree delle superfici esposte ai vettori dello MRSA, i microrganismi e/o i batteri gram negativi sono stati rilevati per il 12% sulle superfici non trattate mentre solo il 4% era presente sulle superfici trattate. Tuttavia però, il fatto che i risultati riguardanti lo MRSA siano stati riuniti a quelli riguardanti i batteri Gram negativi ha oscurato i risultati riguardanti l'effettiva efficacia di questo substrato contro lo MRSA. (Chow et al., 2013).

Scopo dello studio

Lo scopo del presente studio è, quindi, quello di investigare sull'abilità di agire contro lo MRSA, dei rivestimenti (coating) di nano- TiO_2 applicati alle superfici interne.

MATERIALI E METODI

Ceppo MRSA

Per lo studio è stato usato un ceppo sporadico di MRSA che si era mostrato persistente nell'ambiente (Petti et al. 2012). Questo ceppo è stato isolato raccogliendo campioni dai tamponi nasali dei pazienti ospedalizzati. I tamponi sono stati immersi in soluzione salina (9 g/L NaCl, 4°C), posizionati su agar sale mannitolo (MSA) e incubati aerobicamente (37°C, 48 h). Colonie con la morfologia tipica dello *St. aureus* sono state divise in subcolture immerse in brodo di soia triptico (TSB; 37°C, 24 ore). Sui ceppi sono stati eseguiti la colorazione Gram e i test per la coagulasi. I ceppi coagulasi-positivi sono stati identificati utilizzando le card del VITEK-2 per l' "Identificazione Gram Positiva e "test di sensibilità agli antibiotici" (Bio-Mérieux, Italia; Bagno a Ripoli, Italy). Seguendo i criteri del CDC, sono stati considerati MRSA quei ceppi di *Staph. Aureus* che mostravano resistenza alla oxacillina cioè la concentrazione inibente minima, - Minimum Inhibitory Concentration (MIC) >4 µg/mL, - che implicava la presenza della cassetta cromosomica stafilococcica - staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) (Kuehnert et al., 2006).

Superficie clinica da contatto

Una resina sintetica termoplastica è stata usata come superficie ambientale e specificatamente polivinilcloruro (PVC) fatto per il 57% da cloro e per il 43% da carbone. Questo materiale viene spesso usato negli ospedali per ricoprire la pavimentazione e le superfici poiché liscio ma resistente, quindi, facile da pulire, mentre previene l'accumulo dello sporco e dei microorganismi. Due superfici in PVC della stessa grandezza (70x70cm) sono state usate per questo studio. Una superficie (Test) è stata prodotta con l'inserimento omogeneo in massa di nano-TiO₂ (Polimero Ossigenato Plastificato, POP, Pure-HealthTM, Orion srl, Calenzano, Italy), responsabile della disinfezione foto catalitica attivata da una luce fluorescente. Una lampada è stata accesa tre ore prima che la superficie venisse contaminata in modo da far iniziare la fotocatalisi. L'altra superficie invece (Control) non è stata trattata.

Per riprodurre condizioni reali le superfici Test e Control sono state inserite su un tavolo all'interno di padiglione del Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive dell'Università La Sapienza di Roma. Il Padiglione godeva di un'integrazione tra luce artificiale e naturale, le mura erano trasparenti e in parte aperte nella parte superiore. L'area del Padiglione copriva circa 10 m². La velocità dell'aria, la temperatura e l'umidità, misurate durante tutto lo studio che si è tenuto tra Maggio e Luglio 2013, si aggiravano rispettivamente tra 0.00 e 0.03 m/sec, 24.524.5°C e 29.3°C, e 51.4% and 63.7%,

Prima di ogni esperimento, le superfici Test e Control venivano pulite, disinfettate e asciugate per rimuovere microrganismi ambientali residui e particelle che potevano interferire con le procedure sperimentali. Per ogni superficie un panno (32x32 cm - Softtronic; Vermop Italia Professional Cleaning Systems, Milano, Italia. Composizione: 75% poliestere microfibra, 25% poliammide microfibra) veniva imbevuto con acqua di rubinetto e 1-3 ml di sapone disponibile sul commercio (5-10% sodium lauryl sulphate).

Il panno veniva passato gentilmente sulla superficie con movimenti rotatori per due minuti circa. Un altro panno poi veniva imbevuto con 10-20 ml di soluzione diluita 1:10 di sodio ipoclorito (da 5.25% a 6.15%) e veniva usato con movimenti simili e per lo stesso tempo sulla medesima superficie. La soluzione rimaneva a contatto con la superficie per 7 minuti. Per togliere le ultime tracce di sapone disinfettante poi, un ulteriore simile panno veniva imbevuto di acqua sterilizzata o di rubinetto e passata con gli stessi movimenti e modalità sulla superficie per tre minuti.

Contaminazione delle superfici

Il presente studio ha voluto simulare il caso di un vettore di MRSA nasale, responsabile della diffusione aerea di microrganismi nell'ambiente, diffusione che avviene attraverso la perdita di particelle di pelle contenenti gli MRSA, che avviene attraverso il contatto con oggetti e superfici, attraverso la tosse, gli starnuti e il parlare. Il risultato è stato una lenta e continua esposizione di microrganismi sulle superfici ambientali. (Dancer, 2008) con una densità cellulare dello MRSA che si potrebbe considerare moderata e cioè corrispondente a 12-40 unità di formazione delle colonie (cfu)/cm² o alta cioè > 40 cfu/cm² (Mulvey et al., 2011).

Il giorno prima del test, il ceppo MRSA è stato diviso in subcolture immerse in brodo di soia triptico a 37° per 24h. Il giorno del test invece la sospensione di batteri è stata centrifugata e successivamente risospesa e diluita con 1:40 di soluzione salina. In seguito è stata inserita in un piccolo spray da 2 once (Tolco Corporation, Toledo, OH) ed è stata vorticata per un minuto. Per ognuna delle due superfici, lo spray è stato posizionato ad un metro dalla superficie ambientale stessa con un'inclinazione di 45°. La sospensione è stata erogata due volte in modo da produrre una sorta di contaminazione naturale da parte dello MRSA sulla superficie. (Petti et al., 2013).

Campionatura della superficie ambientale.

I campioni della superficie ambientale sono stati raccolti usando piastre Rodac di 24 cm² contenenti MSA che sono state premute gentilmente sulla superficie per 10 secondi con una pressione di circa 25g/cm² senza rotazione o movimenti laterali. Per ogni campione, sono state usate quattro piastre e il materiale è stato preso da diversi punti della superficie. Le piastre da contatto sono state scelte a scapito di altri metodi di campionatura perché sono in grado di fornire i risultati più attendibili per quel che riguarda il recupero dello MRSA sulle superfici ambientali. (Obee et al., 2007).

Ad ogni fase dell'esperimento e per ogni superficie è stato raccolto un campione "pre-esperimento" prima che la superficie venisse contaminata con le sospensioni di MRSA e uno dopo la pulizia e la disinfezione. Questo per verificare che stafilococchi e micrococchi, che potevano proliferare nell'MSA e falsare i risultati dello studio, erano stati correttamente rimossi dalle superfici.

In seguito campioni ambientali sono stati raccolti a diversi intervalli per valutare la densità cellulare dello MRSA. La raccolta di campioni è avvenuta ad intervalli di 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 minuti dopo la contaminazione.

Le piastre sono state incubate a 37°C per 49h in aerobiosi e le colonie sono state contate. Per entrambe le superfici (Test e Control) sono state condotte cinque diverse fasi sperimentali.

Al fine di minimizzare le fonti di contaminazione che avrebbero potuto falsare i risultati dello studio, ad ogni fase dell'esperimento i microbiologi hanno indossato camici bianchi usa e getta così come guanti e mascherine e sono rimasti all'interno del padiglione per tutta la durata dell'esperimento lasciando la porta chiusa. Inoltre, ad ogni fase e per ogni superficie, due terzi delle colonie sono state prese dalle piastre con MSA dopo l'incubazione e sono state sottoposte, come menzionato sopra, a procedure di isolamento e identificazione.

Analisi statistica

Per ogni superficie, fase sperimentale e tempo di campionatura, il numero di cfu di MRSA (unità formanti colonia) ottenuti dalle quattro piastre Rodac è stato sommato e diviso per 96, ottenendo così la densità della cellula espressa in cfu/cm².

Per ogni superficie e tempo di campionatura sono stati calcolati la mediana e il range delle cinque fasi sperimentali. Poi, per ogni tempo di campionatura è stata calcolata anche la differenza tra le superfici Test e Control attraverso il test U di Mann-Whitney per campioni indipendenti, l'alternativa non parametrica più potente al t-test per campioni indipendenti.

La densità delle cellule è stata trasformata in log e la densità media in log è stata calcolata ad ogni campionatura per entrambe le superfici Test e Control. Questi valori sono stati usati per stimare il tempo necessario a raggiungere la soglia igienica microbiologica delle superfici ospedaliere di meno di 1 MRSA per cm² (Dancer, 2004). Per entrambe le superfici Control e Test è stata fatta un'analisi di regressione lineare, la cui variabile indipendente era "il tempo dalla contaminazione" (variabile x espressa in minuti) e la cui variabile dipendente era invece "densità cellulare MRSA log" (variabile y espressa in log cfu/cm²). Poi il coefficiente angolare ("b" nella retta di regressione) e l'intercetta ("a" nella retta di regressione) sono stati stimati col 95% di intervalli di confidenza. La solidità del modello di regressione e delle stime dell'intercetta/coefficiente angolare sono state valutate rispettivamente attraverso R² modificato e T-ratio. Il tempo necessario per raggiungere la soglia igienica per le superfici ospedaliere è stata valutata come segue:

Dalla formula della retta di regressione. $y = a + bx$

La soglia igienica per le superfici ospedaliere $y = 0$ (cioè 0 log cfu/cm², corrispondenti a 1 cfu/cm²)

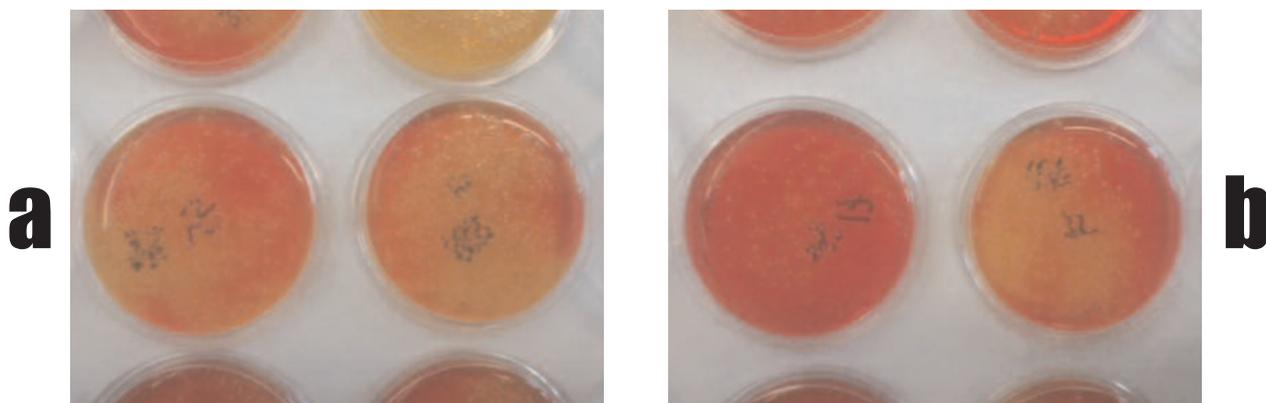
Il valore di X per y = 0 è stato ottenuto dalla formula $x = (-a)/b$.

Il 95% degli intervalli di confidenza sono stati calcolati sostituendo i 95% dei limiti di confidenza più alti e più bassi alle stime puntuali per "a" e "b".

RISULTATI

Sono state necessarie 360 piastre Rodac per portare a termine gli esperimenti. Inoltre, una serie di studi pilota sono stati portati avanti per valutare gli intervalli di tempo più adatti tra le occasioni di campionatura, la durata dell'esperimento e il numero di sprayings (spruzzate) necessari ad ottenere una densità cellulare dello MRSA credibile e più naturale possibile. Tutti questi studi pilota hanno ottenuto come risultato un numero di piastre e di fasi sperimentali comparabile a quelle che sono state utilizzate per la presente analisi. Le procedure di pulizia e disinfezione hanno determinato un livello di contaminazione 0.03 cfu/cm² – **Tavola 3**) che era abbastanza basso da non interferire con i risultati degli esperimenti. La densità cellulare dello MRSA in entrambe le superfici Test e Control era moderata 15 minuti dopo aver spruzzato la sospensione di MRSA (mediana, 27.5 cfu/cm²), è invece cresciuta leggermente per 30 minuti (mediane 43-46 cfu/cm²) e poi è diminuita in modo omogeneo sulle superfici Test e Control per 15 minuti (mediane 35-36 cfu/cm² (**Figura 1a**))

[Figura 1. Le piastre Rodac di MSA dopo l'incubazione rilevata sulle superfici Test (a sinistra) e Control (a destra) una (a) e due (b) ore dopo la contaminazione aerobica. La diminuzione della densità cellulare dello MRSA è percettibile in Test ma non rilevabile in Control.



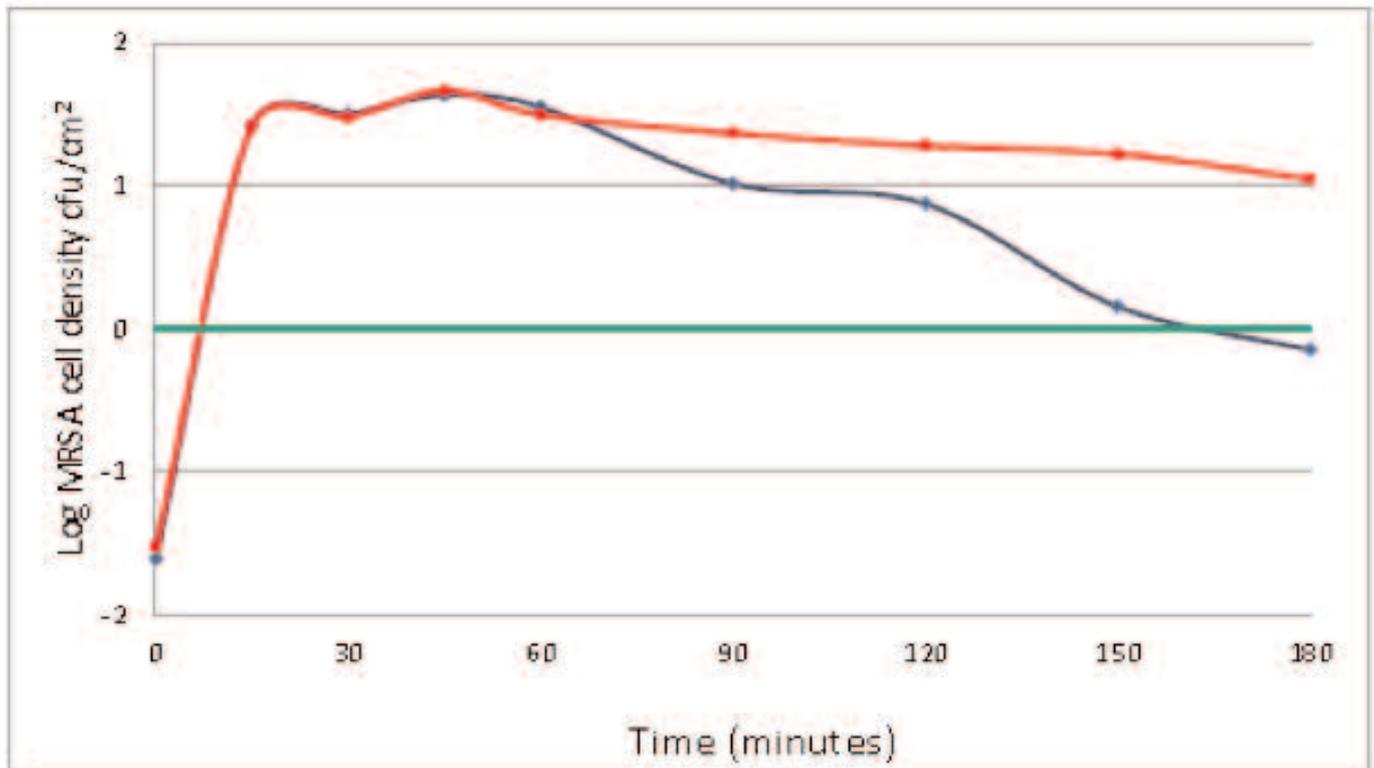
Da quel momento, la diminuzione della densità cellulare si è fatta più significativa sulla superficie TEST e la differenza tra le densità è diventata statisticamente rilevante (mediane 19.5 vs. 7.4 cfu/cm² 120 minuti dopo la contaminazione) (**Figura 1b**). Alla fine dell'esperimento, la densità cellulare sulla superficie TEST era più bassa della soglia igienica per le superfici ospedaliere (mediana , 0.7 cfu/cm²), mentre sulla superficie Control essa era lontana da questo limite (mediana 10.1 cfu/cm²). Su cinque fasi sperimentali, la densità rilevata più bassa dopo 180 minuti dalla contaminazione sulla superficie Control è stata di 8 cfu/cm², mentre sulla superficie Test la densità è risultata sempre più bassa della soglia tranne che in un caso 1.3 cfu/cm².

Tavola 3. La densità cellulare dello MRSA sulle due superfici di PVC contaminate artificialmente attraverso spray. La superficie Test è stata coperta con una sottile pellicola di nano-TiO₂ (Polimero Ossigenato Plastico, POP, Pure-HealthTM, Orion, Calenzano, Italy), responsabile della disinfezione foto catalitica attivata dal fascio di luce fluorescente. Le mediane e i range sono espressi in cfu/cm².

Superficie TEST	Superficie Control	U Test mann-Withney			
Tempo prima della contaminazione	Mediana Range	Mediana	U	Range	Valore di p
MRSA	0.03	0.02-0.05	0.03	0.01-0.05	0.67
15 minuti	27.6	19.1-30.2	27.5	14.9-42.3	0.91
30 minuti	35.1	19.0-40.3	34.3	16.7-51.1	0.91
45 minuti	46.3	31.4-76.1	43.1	29.4-60.8	0.75
60 minuti	35.1	13.3-52.7	36.5	25.6-46.8	0.91
90 minuti	22.2	14.4-37.6	12.7	5.2-16.5	0.01
120 minuti	19.5	13.2-26.6	7.4	5.7-10.4	0.009
150 minuti	16.8	14.3-18.6	1.3	0.8-2.9	0.009
180 minuti	10.1	8.3-16.2	0.7	0.4-1.2	0.009

Col rosso si sottolineano le differenze statisticamente rilevanti tra le densità cellulari delle superfici Test e Control.

L'andamento della densità cellulare dello MRSA è mostrato nella figura 2. La veloce crescita è avvenuta subito dopo la contaminazione – tra 0 e 15 minuti, e con essa è cresciuta costantemente la densità che è continuata per 45 minuti. Ciò è visibile dalle rette Test e Control che si sovrappongono. Poi, le due rette hanno cominciato a divergere, la densità cellulare dello MRSA sulla superficie Control è rimasto sul livello di 1 log cfu/cm², corrispondente a 10 cfu/cm² per tutta la durata dell'esperimento, mentre sulla superficie Test la densità è scesa sotto il livello igienico soglia delle superfici ospedaliere (retta verde) nel giro di due ore.



Le due rette di regressione che avevano come variabili “tempo dalla contaminazione” e “densità cellulare log dello MRSA” (tavola 4) hanno mostrato una bontà del fit piuttosto alta. E Infatti, sono stati riscontrati i valori R2 arrotondati per eccesso (0.7 e 0.8 rispettivamente per Control e per Test) e l’intercetta e il coefficiente angolare statisticamente rilevanti. Le stime sul tempo richiesto per raggiungere la soglia igienica delle superfici ospedaliere quindi sono state solide. Tale stima si aggirava per la superficie Test tra 1 h e 46 minuti e 6 ore e 29 minuti, con il 95% delle probabilità, mentre per la superficie Control si aggirava tra le 6 ore e 27 minuti e le 26 ore e 54 minuti con il 95% delle probabilità. In altre parole, il tempo necessario per raggiungere la soglia igienica per superfici ospedaliere si allungava da 3 a 5 volte per la superficie Control rispetto alla superficie Test.

Tavola 4.

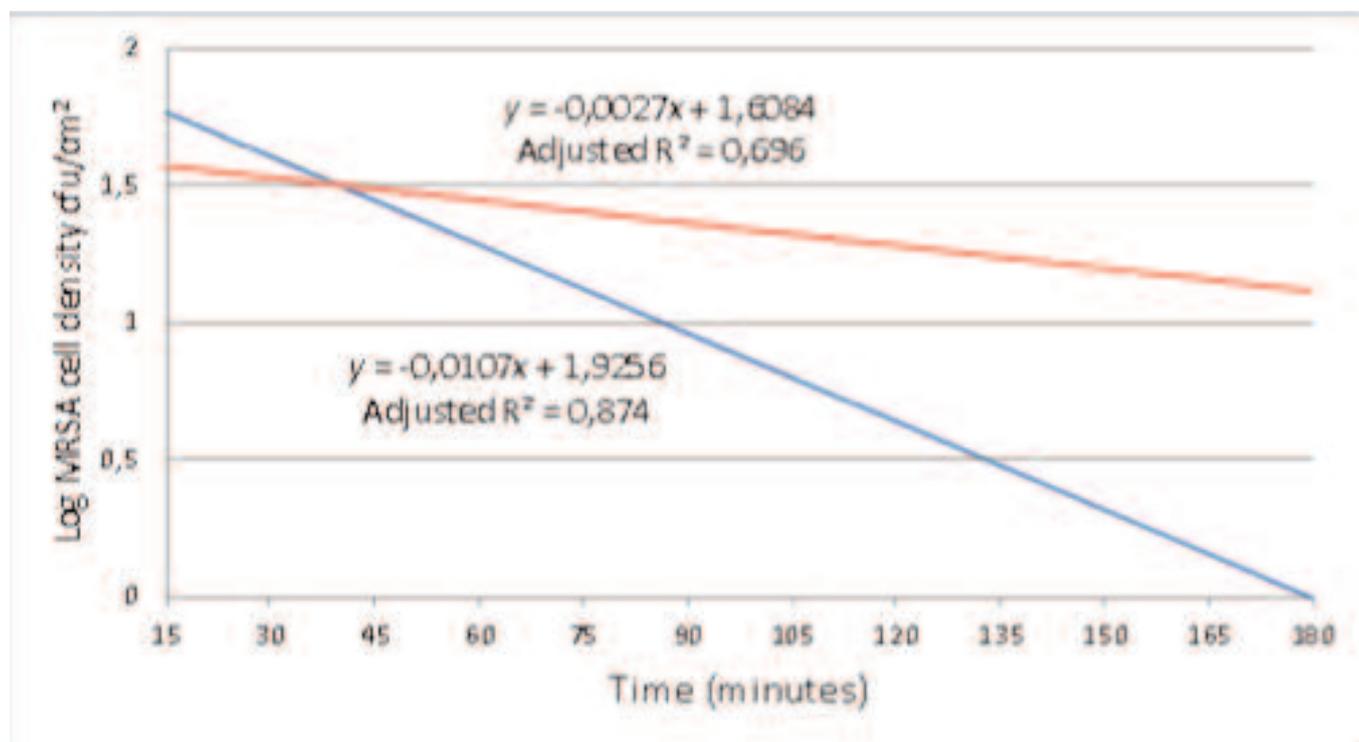
Analisi di regressione delle trendlines della densità cellulare dei log MRSA su entrambe le superfici Test e Control.

Si mostrano l’Intercetta, coefficiente angolare, valore di x per y=0, corrispondente al tempo necessario stimato per raggiungere lo standard igienico per le superfici ospedaliere 1 cfu/cm2 corrispondente a 0 log cfu/cm2)- con il 95% di intervallo di confidenza tra parentesi.

Superficie	Intercetta	Coefficiente angolare	Tempo necessario per y=0	R2
Control	1.6084 (1.4413 - 1.7756)*	-0.0027 (-0.0044 - -0.0011)*	595.7 (327.6 - 1614.2)	0.696
Test	1.9256 (1.5432 - 2.3080)*	-0.0107 (-0.0145 - -0.0070)*	180.0 (106.4 - 329.7)	0.874

Le due trend-lines di regressione vengono mostrate nella figura 3. La differenza tra le due rette risiede principalmente nel coefficiente angolare, la retta della superficie Test infatti risulta molto inclinata e l'intercetta con l'asse x è relativamente vicina all'asse y, mentre la retta della superficie Control è praticamente piatta e l'intercetta con l'asse x è lontana dal grafico.

Figura 3. Trend lines della densità cellulare dei Log MRSA nelle superfici Test (blu) e Control (rosso) valutate attraverso l'analisi di regressione. I valori di x per y=0 sono 595.7 per Control, corrispondenti a 9 ore e 56 minuti e 180 per la superficie Test, corrispondenti a 3 ore.



ESPOSIZIONE

Il problema riguardante la sopravvivenza dello MRSA in ambiente ospedaliero è grave perché gli individui infetti spesso sono immunodepressi e, quindi, diversamente dalle infezioni da stafilococco contratte in comunità (CA-MRSA), che generalmente interessano soggetti sani, le infezioni contratte in ospedale (HA-MRSA) spesso portano ad un alto tasso di letalità. Infatti, il numero di morti annuale da infezioni di MRSA negli US è più alto del numero di morti per HIV e per i virus dell'Epatite (Boucher and Corey, 2008), mentre più di 5.000 morti possono essere attribuite ogni anno alle infezioni da MRSA in Europa (Köck et al., 2010). Inoltre, la dose infettante necessaria ad essere colonizzata dallo MRSA potrebbe essere più bassa di cinque cellule (Dancer, 2014). Per queste ragioni l'attività antibatterica della fotocatalisi è stata testata contro lo MRSA in questo studio. Un'altra ragione è stata anche che i batteri Gram-positivi sono più resistenti alla disinfezione fotocatalitica e per questo, lo MRSA rappresenta un valido test d'efficacia. (Foster et al., 2011).

Questo studio ha riprodotto condizioni reali di pazienti infettati dallo MRSA che diffondono tali microrganismi nell'ambiente ospedaliero perdendo piccoli frammenti di pelle sui quali si annida lo MRSA oppure toccando oggetti o superfici, tossendo, starnutando e parlando. Tutto questo porta ad avere una contaminazione dell'aria e delle superfici.

In condizioni reali, la densità della contaminazione della superficie è relativamente bassa. Infatti, gli studi sui pazienti infetti, che producono carica microbica, mostrano che la densità cellulare dello MRSA sulle superfici ospedaliere e sui pavimenti di solito si aggira tra <1 a 50 cfu/cm² (Rutala et al., 1983; Boyce et al., 2007; Otter et al., 2011).

Sebbene diversi studi abbiano cercato di valutare l'attività antimicrobica delle pellicole di nano-TiO₂ contro lo MRSA, questo è il primo che produce implicazioni pratiche per le strutture sanitarie perché l'attività antibatterica è stata valutata in condizioni ospedaliere reali. Infatti, nello studio prima menzionato dell'ospedale universitario, non era stato possibile valutare se l'azione disinfettante della pellicola nano-TiO₂ fosse diretta contro lo MRSA o contro i batteri Gram negativi. (Chow et al., 2013). Studi di laboratorio hanno riportato risultati contrastanti. In uno di questi è stato utilizzato un doppio strato di pellicole TiO₂/cuO, che combinano l'attività antimicrobica della fotocatalisi e ioni metallici. I livelli di MRSA hanno mostrato una diminuzione limitata in due ore, passando da un $\log_{10} 6$ a $>\log_{10} 5$ cfu (l'attività antibatterica è stata quindi di $<1 \log_{10}$ cfu) mentre l'eliminazione totale dei batteri ha richiesto più di 24 ore. Anche la densità dello MRSA verificata era plausibile per la contaminazione dell'ambiente ospedaliero. (Foster et al., 2012). Un altro studio di laboratorio, che ha studiato l'attività della fotocatalisi con argento, ha usato pellicole di nano-TiO₂ e ha mostrato risultati simili. Infatti, questo studio ha dimostrato la diminuzione dei livelli di MRSA di meno di $1 \log_{10}$ cfu, passando da $\log_{10} 5$ a $>\log_{10} 4$ cfu dopo due ore di esposizione. Ancora una volta la carica di MRSA era troppo alta. Cosa molto interessante però, questo studio ha messo in luce anche la totale degradazione della parete cellulare batterica, che è particolarmente spessa nei batteri gram-positivi come lo MRSA, degradazione che è dovuta al processo di fotocatalisi. (Tallósy et al., 2014). Infine, un altro studio che ha osservato l'attività di sottili pellicole d'argento e titanio, ha scoperto che le pellicole di TiO₂, usate come controllo, non riportavano attività antibatterica contro i MRSA ad un livello di densità di 10^5 cfu (Inoue et al., 2010).

Riassumendo i dati riportati dagli studi precedenti, l'attività antibatterica della fotocatalisi da TiO₂ ha portato ad una diminuzione della carica dello MRSA di meno di $1 \log_{10}$ cfu, corrispondente a meno del 90%, entro due ore dall'esposizione. Il presente studio ha confermato tale attività entro le due ore, come dimostrato nella figura 2, ma ha aggiunto altre informazioni pratiche. Infatti, partendo dai livelli di densità cellulare simili a quelli che di solito si incontrano sulle superfici ospedaliere contaminate, è stato possibile osservare un'attività anti batterica che andava oltre $1 \log_{10}$ cfu entro tre ore dall'esposizione e, ancor più importante, la densità cellulare dello MRSA era diminuita a livelli di sicurezza. (cioé., $<\log_{10} 0$ cfu/cm²). L'attività fotocatalitica disinfettante quindi, potrebbe essere presa in considerazione, insieme agli altri metodi di controllo convenzionali sullo MRSA negli ospedali e in altre strutture sanitarie. Questo soprattutto laddove le misure di controllo non siano abbastanza, così come nei reparti di terapia intensiva o ustioni.

Tutti i metodi convenzionali di controllo dello MRSA utilizzati sinora mostrano però degli inconvenienti. La disinfezione è uno di questi. Infatti, 7 minuti di contatto tra la varechina e le superfici lisce contaminate dalla luce in modo da limitare la densità cellulare (cioé., 10 - 14 cfu/cm²) sono sufficienti a diminuire la densità ai valori minimi (i.e., 0.03 cfu/cm²), valori più bassi dello standard igienico delle superfici ospedaliere. (Petti et al., 2013).

Inoltre, l'uso di disinfettanti è spesso condizionato dalle caratteristiche di alcune superfici, come la porosità, ruvidità e sensibilità ad agenti chimici, etc, che possono diminuire la loro efficacia o impedirne addirittura l'uso. L'attività residuale può esporre il personale sanitario e i pazienti al rischio di inalazione di composti tossici e cancerogeni. Inoltre, sembra che lo MRSA possa sviluppare dei geni di resistenza ai biocidi come la resistenza ai composti di ammonio quaternario plasmidico e la resistenza al triclosan che si evolve subito dopo l'esposizione (Cimolai, 2008).

La sopravvivenza dello MRSA sui panni usati per la disinfezione è un altro problema, dal momento che riutilizzare questi panni consente una contaminazione a sua volta di ambienti secondari durante una nuova pulizia (Cheng et al., 2011).

La pulizia è un altro metodo di controllo effettivo dello MRSA; è in grado di diminuire la densità cellulare sulle superfici lisce ad un livello moderato o più basso rispetto allo standard igienico per le superfici ospedaliere. Tuttavia, ancora una volta, le caratteristiche delle superfici sono cruciali (Petti et al., 2013). Inoltre, l'efficacia di una pulizia più approfondita si basa principalmente sulla coscienza dello staff e sulla capacità umana di dedicarsi a queste misure di pulizia, due condizioni che spesso sono difficili da raggiungere (Dancer, 2014).

Altri metodi ambientali di controllo dello MRSA non sono del tutto convincenti. Per esempio l'uso di barriere di protezione usa e getta è efficace ma impraticabile per gli elevati costi e per il tempo e perché i materiali per le barriere usa e getta hanno un forte impatto ambientale (Petti et al., 2013).

La luce UV pulsata allo xeno è in parte efficace ma è anch'essa molto costosa e il suo uso è limitato da fattori ambientali come l'umidità e le caratteristiche delle superfici. (Dancer, 2014; Jinadatha et al., 2014) I vapori di perossido d'idrogeno mostrano invece effetti variabili (Dancer, 2014).

Questi dati suggeriscono che la soluzione migliore per raggiungere una completa eliminazione dello MRSA dalle superfici ambientali ospedaliere probabilmente risiede nella combinazione di metodi basilari, come la disinfezione, con metodi supplementari. Uno di questi è certamente l'uso delle coperture (coatings) di nano-TiO₂. In effetti, questo metodo ha diversi meriti. Prima di tutto il nano-TiO₂ è un catalizzatore e quindi la sua attività dipende dall'attivazione della luce ed è per questo inesauribile. Secondo, la disinfezione delle superfici ad opera di una reazione foto catalitica è meno tossica e cancerogena dei disinfettanti chimici. Terzo, l'attività antimicrobica delle coperture di nano-TiO₂ è non selettiva e impedisce ai microrganismi di sviluppare resistenza al trattamento. Quarto, l'attività antimicrobica non è influenzata dalle caratteristiche della superficie perché avviene quando i microrganismi sono a diretto contatto con la superficie o vicino ad essa. (Dancer, 2014; Foster et al., 2011; Joost et al., 2015).

CONCLUSIONE

La presente analisi ha dimostrato che tre ore di esposizione ad una disinfezione fotocatalitica dovuta al POP (Polimero Ossigenato Plastificato) Pure Health contenente nano-TiO₂ può bastare per eliminare lo MRSA da dei livelli di alta densità cellulare (come di solito si riscontrano nelle superfici degli ospedali contaminati) a dei livelli molto bassi che minimizzano il rischio di trasmissione di infezione attraverso le superfici ambientali. Questo metodo di disinfezione può avere importanti effetti pratici e concreti nella progettazione delle attrezzature sanitarie.

REFERENCES

- Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008;46(Suppl. 5):S344-9.
- Boyce JM, Havill NL, Otter JA, Adams NM. Widespread environmental contamination associated with patients with diarrhea and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of the gastrointestinal tract. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28(10):1142-7.
- Cheng KL, Boost MV, Chung JW. Study on the effectiveness of disinfection with wipes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and implications for hospital hygiene. *Am J Infect Control* 2011;39(7):577-80.
- Chow WL, Tin AS, Lim WW, Lim J, Kurup A, Ling ML, Tan AL, Ong BC. Efficacy of titanium dioxide compounds in preventing environmental contamination by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Infect Control* 2013;9:3.
- Cimolai N. MRSA and the environment: implications for comprehensive control measures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27(7):481-93.
- Dancer SJ. How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *J Hosp Infect* 2004;56(1):10-5.
- Dancer SJ. Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infect Dis* 2008;8(2):101-13.
- Dancer SJ, White LF, Lamb J, Girvan EK, Robertson C. Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study. *BMC Med* 2009;7:28.
- 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.
- Datta R, Platt R, Yokoe DS, Huang SS. Environmental cleaning intervention and risk of acquiring multidrug-resistant organisms from prior room occupants. *Arch Intern Med* 2011;171(6):491-4.
- Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;90(6):1847-68.
- Foster HA, Sheel DW, Evans P, Sheel P, Varghese S, Elfakhri SO, Hodgkinson JL, Yates HM. Antimicrobial Activity Against Hospital-related Pathogens of Dual Layer CuO/TiO₂ Coatings Prepared by CVD. *Chem Vap Deposition* 2012;18(4-6):140-6.
- Hardy KJ, Oppenheim BA, Gossain S, Gao F, Hawkey PM. A study of the relationship between environmental contamination with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and patients' acquisition of MRSA. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27(2):127-32.

- Inoue Y, Uota M, Torikai T, Watari T, Noda I, Hotokebuchi T, Yada M. Antibacterial properties of nanostructured silver titanate thin films formed on a titanium plate. *J Biomed Mater Res A* 2010;92(3):1171-80.
- Jinadatha C, Quezada R, Huber TW, Williams JB, Zeber JE, Copeland LA. Evaluation of a pulsed-xenon ultraviolet room disinfection device for impact on contamination levels of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Infect Dis* 2014;14:187.
- Joost U, Juganson K, Visnapuu M, Mortimer M, Kahru A, Nõmmiste E, Joost U, Kisand V, Ivask A. Photocatalytic antibacterial activity of nano-TiO₂ (anatase)-based thin films: Effects on *Escherichia coli* cells and fatty acids. *J Photochem Photobiol B* 2015;142:178-85.
- Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill* 2010;15(41):19688.
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130.
- Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, McDougal LK, Chaitram J, Jensen B, Fridkin SK, Killgore G, Tenover FC. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis* 2006;193(2):172-9.
- Mitchell BG, Digney W, Locket P, Dancer SJ. Controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a hospital and the role of hydrogen peroxide decontamination: an interrupted time series analysis. *BMJ Open* 2014;4(4):e004522.
- Mulvey D, Redding P, Robertson C, Woodall C, Kingsmore P, Bedwell D, Dancer SJ. Finding a benchmark for monitoring hospital cleanliness. *J Hosp Infect* 2011;77(1):25-30.
- Obee P, Griffith CJ, Cooper RA, Bennion NE. An evaluation of different methods for the recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from environmental surfaces. *J Hosp Infect* 2007;65(1):35-41.
- 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.
- Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control* 2013;41(Suppl 5):S6-11.
- Petti S, Polimeni A. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission in the dental healthcare setting: a narrative review. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32(11):1109-15.
- Petti S, De Giusti M, Moroni C, Polimeni A. Long-term survival curve of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on clinical contact surfaces in natural-like conditions. *Am J Infect Control* 2012;40(10):1010-2.

- Petti S, Polimeni A, Dancer SJ. Effect of disposable barriers, disinfection, and cleaning on controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* environmental contamination. *Am J Infect Control* 2013;41():836-40.
- Rampling A, Wiseman S, Davis L, Hyett AP, Walbridge AN, Payne GC, Cornaby AJ. Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2001;49(2):109-16.
- Rutala WA, Katz EB, Sherertz RJ, Sarubbi FA Jr. Environmental study of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic in a burn unit. *J Clin Microbiol* 1983;18(3):683-8.
- Simmons S, Morgan M, Hopkins T, Helsabeck K, Stachowiak J, Stibich M. Impact of a multihospital intervention utilizing screening, hand hygiene education and pulsed xenon ultraviolet (PXUV) on the rate of hospital associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Prevent* 2013;14(5):172-44.
- Tallósy SP, Janovák L, Ménesi J, Nagy E, Juhász Á, Balázs L, Deme I, Buzás N, Dékány I. Investigation of the antibacterial effects of silver -modified TiO₂ and ZnO plasmonic photocatalysts embedded in polymer thin films. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;21(19):11155-67.
- Weber DJ, Rutala WA. Understanding and Preventing Transmission of Healthcare- Associated Pathogens Due to the Contaminated Hospital Environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;34(5):449-52.
- Wilson AP, Smyth D, Moore G, Singleton J, Jackson R, Gant V, Jeanes A, Shaw S, James E, Cooper B, Kafatos G, Cookson B, Singer M, Bellingan G. The impact of enhanced cleaning within the intensive care unit on contamination of the near-patient environment with hospital pathogens: a randomized crossover study in critical care units in two hospitals. *Crit Care Med* 2011;39(4):651-8.