

Biokontrolle harter Oberflächen in Krankenhäusern mit Reinigungsprodukten auf mikrobieller Basis

Alberta Vandini¹, Robin Temmerman^{2,3}, Alessia Frabetti¹, Elisabetta Caselli⁴, Paola Antonioli⁵, Pier Giorgio Balboni⁴, Daniela Platano⁶, Alessio Branchini⁷, Sante Mazzacane^{1*}

1 CIAS Laboratorio, Zentrum für Studien der physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Kontamination in hochsterilen Umgebungen, Fachbereich: Architektur, Universität Ferrara, Ferrara, Italien, **2** Laboratorium für Mikrobielle Ökologie und Technologie, Universität Gent, Belgien, **3** Chrisal Forschungs- und Entwicklungsabteilung, Lommel, Belgien, **4** Medizinische Fakultät, Fachbereich: Mikrobiologie, Universität Ferrara, Ferrara, Italien, **5** Abteilung für Infektionsprävention und -kontrolle und Risikomanagement, Universitätsklinikum Ferrara, Ferrara, Italien, **6** Fachbereich: Biomedizinische und Neuromotorische Wissenschaften, Universität Bologna, Bologna, Italien, **7** Fachbereich: Biowissenschaften und Biotechnologie, Universität Ferrara, Ferrara, Italien

Zusammenfassung

Hintergrund: Therapieassoziierte Infektionen (TAI) sind eine der am häufigsten in Einrichtungen des Gesundheitswesens auftretenden Komplikationen. Kontaminierte Umgebungsflächen stellen eine wesentliche potenzielle Quelle für die Übertragung von vielen therapieassoziierten Pathogenen dar, was die Notwendigkeit neuer und nachhaltiger Strategien verdeutlicht.

Ziel: Das Ziel dieser Studie bestand darin, die Wirkung eines neuartigen, auf Biokontrollmechanismen basierenden Reinigungsverfahrens auf die Präsenz und das Überleben diverser für TAI verantwortlicher Mikroorganismen (d.h. Coliforme, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* und *Candida albicans*) auf harten Oberflächen in einer Krankenhausumgebung zu evaluieren.

Methoden: Die Wirkung der mikrobiellen Reinigung mit einem Produkt, welches Sporen der Bakterien *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* und *Bacillus megaterium* in Lebensmittelqualität enthält, wurde im Vergleich zu konventionellen Reinigungsprotokollen über einen Zeitraum von 24 Wochen in drei unabhängigen Krankenhäusern (von denen sich eins in Belgien und die anderen beiden in Italien befinden) beurteilt. Außerdem wurden etwa 20.000 mikrobielle Oberflächenproben genommen.

Ergebnisse: Die mikrobielle Reinigung im Rahmen des täglichen Reinigungsprotokolls führte zu einer Reduzierung von TAI-assoziierten Pathogenen um 50 bis 89 %. Dieser Effekt wurde nach 3-4 Wochen erreicht, und die Reduzierung der Pathogenbelastung blieb langzeitstabil. Außerdem beobachteten wir bei der abwechselnden Anwendung der mikrobiellen und konventionellen Reinigungsmethode, dass dieser Effekt in direktem Zusammenhang mit der neuen Methode steht, wie der Anstieg des KBE/m² bei Anwendung der konventionellen statt der mikrobiellen Methode unterstreicht. Obwohl viele Fragen im Hinblick auf die tatsächlich verantwortlichen Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind, zeigt diese Studie, dass die mikrobielle Reinigung eine wirksamere und nachhaltigere Alternative zur chemischen Reinigung und zur unspezifischen Desinfektion in Gesundheitseinrichtungen darstellt.

Schlussfolgerungen: Diese Studie hat ergeben, dass es sich bei der mikrobiellen Reinigung um eine effektive Strategie zur kontinuierlichen Verringerung der Anzahl von TAI-assoziierten Mikroorganismen auf Oberflächen handelt. Die ersten Hinweise auf die tatsächlichen TAI-Vorkommen in den kontinuierlich untersuchten Krankenhäusern sind vielversprechend und könnten den Weg für eine neue und kosteneffektive Strategie zur Bekämpfung oder (Bio)kontrolle therapieassoziiierter Pathogene bereiten.

Zitate: Vandini A, Temmerman R, Frabetti A, Caselli E, Antonioli P, et al. (2014) Hard Surface Biocontrol in Hospitals Using Microbial-Based Cleaning Products. PLoS ONE 9(9): e108598. doi:10.1371/journal.pone.0108598

Herausgeber: Gabriele Berg, TU Graz, Österreich

Einreichung: 25. Mai 2014; **Annahme:** 23. August 2014; **Publikation:** 26. September 2014

Copyright: © 2014 Vandini et al. Dieser Artikel ist frei zugänglich und wird unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License zur Verfügung gestellt, die die uneingeschränkte Verwendung, Verbreitung und Vervielfältigung in jeglicher Form gestattet, allerdings unter der Voraussetzung, dass der Autor und die Quelle angegeben werden.

Datenverfügbarkeit: Die Autoren bestätigen, dass sämtliche den Ergebnissen zugrundeliegenden Daten uneingeschränkt verfügbar sind. Alle relevanten Daten sind in diesem Artikel und den dazugehörigen Dateien mit den ergänzenden Informationen enthalten.

Finanzierung: Diese Studie wurde durch COPMA srl, Chrial NV und das Flämische Institut zur Förderung von Innovationen durch Wissenschaft und Technik (IWT - Vlaanderen, Brüssel, Belgien) finanziert. Die Förderer waren jedoch weder am Studiendesign noch an der Datensammlung und -analyse, an der Publikationsentscheidung oder Erstellung des Manuskripts beteiligt.

Konkurrierende Interessen: Die Autoren erklären, dass sie finanzielle Unterstützung von dem kommerziellen Unternehmen Copma srl erhalten haben, und dass Dr. Robin Temmerman mit einem diese Studie durch Finanzmittel unterstützenden kommerziellen Unternehmen Verbindungen unterhält (Chrial, Lommel, Belgien). Diese Umstände beeinflussen jedoch nicht die Einhaltung der PLOS-ONE-Richtlinien für den Austausch von Daten und Materialien durch die Autoren.

* [Email: sante.mazzacane@unife.it](mailto:sante.mazzacane@unife.it)

Einleitung

Therapieassoziierte Infektionen (TAI) sind eine der am häufigsten in Einrichtungen des Gesundheitswesens auftretenden Komplikationen, die weltweit ein großes Problem in Bezug auf die Sicherheit und Qualität der Gesundheitsversorgung [1] darstellen, wie man auch einem kürzlich veröffentlichten Bericht der Weltgesundheitsorganisation entnehmen konnte, in dem die krankenhausbezogene Prävalenz in Ländern mit hohem Einkommen auf 8 % geschätzt wurde [2]. Das Europäische Zentrum für die Prävention von Krankheiten bestätigte in einer Punkt-Prävalenz-Studie, dass therapieassoziierte Infektionen ein Hauptproblem des öffentlichen europäischen Gesundheitssektors darstellen, und dass deren Prävalenz bei 5,7 % (4,5–7,4 %) liegt, was pro Tag 81.089 (64.624–105.895) Patienten mit einer TAI in europäischen Intensivkrankenhäusern entspricht [3]. Diese europäische Studie enthielt eine ähnliche Schätzung für nosokomiale Infektionen in Italien und Belgien, wo der prozentuale Anteil von Patienten mit TAI den Berechnungen zufolge bei 6,3 % (5,4–7,4 %) bzw. 7,1 % (6,1–8,3 %) liegt [1]. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studie lag die geschätzte jährliche Anzahl von Patienten mit einer TAI in europäischen Intensivkrankenhäusern von 2011 bis 2012 bei 3,2 Millionen, allerdings mit einem großen Konfidenzintervall von 1,9 bis 5,2 Millionen Patienten. Ähnliche Inzidenzen wurden in den USA festgestellt [4]. Abgesehen vom menschlichen Leid sind auch beeindruckend hohe volkswirtschaftliche Kosten mit dem TAI-Management verbunden. Der Bericht der Zentren für die Kontrolle und Prävention von Krankheiten (CDC) enthielt Schätzungen, die besagen, dass die tatsächlichen direkten Gesamtkosten des Gesundheitswesens für therapieassoziierte Infektionen in US-amerikanischen Krankenhäusern pro Jahr zwischen 35,7 und 45 Milliarden Dollar liegen [5]. Außerdem stellt das Management, die Prävention und die Überwachung von TAI heutzutage immer noch eine Herausforderung für Gesundheitseinrichtungen dar [6,7].

Die am häufigsten aus TAI isolierten Mikroorganismen sind (in absteigender Reihenfolge): *Escherichia coli* (15,9 %), *Staphylococcus aureus* (12,3 %), *Enterococcus spp.* (9,6 %), *Pseudomonas aeruginosa* (8,9 %), *Klebsiella spp.* (8,7 %), *koagulase-negative Staphylokokken* (7,5 %), *Candida spp.* (6,1 %), *Clostridium difficile* (5,4 %), *Enterobacter spp.* (4,2 %), *Proteus spp.* (3,8 %) und *Acinetobacter spp.* (3,6 %) [3].

Eine sehr kontroverse und viel diskutierte Frage betrifft die qualitative und quantitative Rolle der Umgebung bei der Kontaminierung von Patienten, insbesondere der Einfluss von stationärer Unterbringung und Möbeloberflächen. Es ist allseits bekannt, dass Oberflächen als Reservoirs für Mikroorganismen dienen und zur Übertragung von Krankenhauspathogenen beitragen können,

wodurch sich das Risiko der Kreuzkontamination durch indirekten Kontakt mit Patienten erhöht [8–10]. Um dieses Risiko zu reduzieren, werden Hygienemaßnahmen an jeder Oberfläche vollzogen, die direkt oder indirekt in Kontakt mit Menschen kommen könnte. Obwohl experimentelle Ergebnisse darauf hindeuten, dass ein vernünftiger Einsatz von Desinfektionsmitteln empfehlenswert ist, wird deren routinemäßiger Gebrauch immer noch kontrovers diskutiert [11,12]. Dennoch wird in allen internationalen Richtlinien eine angemessene Oberflächendesinfektion als wichtige Maßnahme zur Prävention von Infektionen empfohlen [13–17], und es gibt zahlreiche Anhaltspunkte dafür, dass sich die Hygiene von Krankenhäusern vorteilhaft auf die Reduzierung von TAI auswirkt [18]. Tatsächlich kann eine mangelhafte Reinigung und Sterilisation oder Desinfektion zur Übertragung von Pathogenen von Patient zu Patient führen [19].

Dennoch birgt der weitverbreitete Einsatz von chemischen Desinfektionsmitteln Risiken für die Umwelt und die Sicherheit des Personals. Es ist bekannt, dass sich Mikroorganismen an eine Vielzahl von physikalischen und chemischen Umweltbedingungen anpassen können. Daher überrascht es nicht, dass Fälle von Resistenzen durch übermäßigen Gebrauch von Antiseptika und Desinfektionsmitteln berichtet werden [20,21]. Dementsprechend ergibt sich aus der Bedeutung von Reinigungsmaßnahmen für die Kontrolle der Belastung mit pathogenen Bakterien, dass ein Bedarf für eine neue und nachhaltige Strategie besteht.

Ein sehr vielversprechender Ansatz, der von Falagas & Makris im Jahre 2009 vorgeschlagen wurde, besteht in der Verwendung von nicht-pathogenen Mikroorganismen, die Probiotika genannt und als lebende Mikroorganismen definiert werden, die bei einem Wirt für einen gesundheitlichen Nutzen sorgen und auf harten Oberflächen Kolonien bilden können, welche der Proliferation von anderen Bakterienspezies entgegenwirken können [22], was dem Konkurrenzausschlussprinzip (Gauses Gesetz) entspricht [23–25]. Dieses Konzept wird Biokontrolle genannt, insofern die Anwendung erfolgt, um einem bestimmten Pathogen entgegenzuwirken [26]. Bei der Bekämpfung von Legionellen in Wassersystemen konnte dieses Konzept bereits erfolgreich angewendet werden [27].

Diverse Untersucher haben bereits darauf verwiesen, dass Mikroorganismen probiotischer Art und ihre Biotenside dem Wachstum von nosokomialen Pathogenen auf unbelebten Oberflächen entgegenwirken können [28–32]. Trotzdem wurde die tatsächliche Verwendung von Mikroorganismen probiotischer Art auf harten Oberflächen als Reinigungsverfahren bisher noch nicht wissenschaftlich untersucht. Aus diesem Grund besteht das Ziel dieser Studie in der Beurteilung der Auswirkungen der mikrobiellen Reinigung von harten Oberflächen in Krankenhäusern auf die Präsenz und/ oder das Überleben von TAI-assoziierten Mikroorganismen auf diesen behandelten Oberflächen. Um die statistische Aussagekraft der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Studie in drei unabhängigen Krankenhäusern durchgeführt, von denen sich eines in Belgien und zwei in Italien befinden. Der Vergleich erfolgte anhand von Protokollen

zur chemischen Reinigung und Desinfektion. Diese Studie sollte ausreichend Daten hervorbringen, um Schlussfolgerungen bezüglich der Fragestellung zu ermöglichen, ob die Anwendung der Biokontrolltechnologie auf Krankenhausoberflächen eine nachhaltige Alternative zu chemischen Desinfektionsmitteln darstellt.

Methoden

Vorversuche

Vor den tatsächlichen Feldversuchen in den Krankenhäusern wurden einige Vorversuche an den Universitäten in Gent und Ferrara sowie im AZ Lokeren Krankenhaus durchgeführt, um die am besten geeignete Zusammensetzung der zum Einsatz kommenden mikrobiellen Reinigungsprodukte zu ermitteln. Hauptsächlich sollte die Art und Konzentration der in den Reinigungsprodukten enthaltenden Mikroorganismen anhand der durchschnittlichen mikrobiologischen Belastung auf harten Oberflächen sowie des pH-Wertes, der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit ausgewählt werden. Die in den Feldversuchen angewendeten mikrobiellen Reinigungsprodukte enthielten Sporen von *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* und *Bacillus megaterium* in einer festgelegten Quantität von 5610^7 KBE (koloniebildenden Einheiten) pro ml des Produktkonzentrats. Sämtliche Produkte wurden von dem Unternehmen Chrisal (Lommel, Belgien) hergestellt. Chrisal belieferte das AZ Lokeren Krankenhaus und Copma srl. (Ferrara, Italien) die beiden italienischen Krankenhäuser.

Um eine eventuelle Verzerrung der Ergebnisse bei den finalen Krankenhausuntersuchungen wegen den in den Produkten enthaltenen Reinigungsmitteln zu verhindern, wurden einige Feldversuche im AZ Lokeren Krankenhaus durchgeführt, in denen die Effekte der in den Krankenhausuntersuchungen zu verwendenden mikrobiellen und nicht-mikrobiellen Produktversionen verglichen wurden (Daten nicht enthalten).

Ethische Grundsätze

Das Studienprotokoll wurde von den lokalen Ethik-Kommissionen überprüft und genehmigt. Die Versuche in den beiden Krankenhäusern mit Sitz in Ferrara (Sant'Anna und San Giorgio) wurden von der Ethik-Kommission Comitato Unico della Provincia di Ferrara (Einziges Komitee der Provinz Ferrara) der Azienda Ospedaliero-Universitaria von Ferrara (Ferrara, Italien) genehmigt. In Bezug auf das AZ Lokeren Krankenhaus wurde die Studie vom AZ Lokeren Ethisch Comité (Lokeren, Belgien) überprüft und genehmigt. Die beiden Ethik-Kommissionen gaben an, dass eine förmliche Genehmigung nicht notwendig sei, da die probiotischen Produkte nicht direkt an Patienten angewendet werden, sondern nur zur Reinigung von Krankenhausoberflächen eingesetzt werden

sollen. Aufgrund der reinen Beobachtungsnatur der Studie verzichteten die Kommissionen auf die Einholung einer schriftlichen Einwilligungserklärung von den Teilnehmern.

Versuchsaufbau in den Krankenhäusern

Es wurden drei voneinander unabhängige Krankenhausuntersuchungen zu unterschiedlichen Zeiten und an unterschiedlichen Orten durchgeführt. An jedem Versuchsort wurde ein Vergleich zwischen der Reinigung mit mikrobiellen Reinigungsprodukten und den konventionellen Hygienemaßnahmen (mit chemischen Reinigungsprodukten und Desinfektionsmitteln) vorgenommen. Die eingesetzten Kontrollreinigungsprodukte im AZ Lokeren Krankenhaus enthielten chemische Reinigungsmittel (Ecolab, Groot-Bijgaarden, Belgien) und in den beiden italienischen Krankenhäusern Reinigungsmittel auf Chlorbasis (Actichlor für alle abwaschbaren Oberflächen, Diversey S.p.A., Italien). Die mikrobiellen Reinigungsprodukte in allen drei Krankenhäusern beinhalteten einen Fußbodenreiniger, einen Innenraumreiniger und einen Badreiniger (Chrisal, Lommel, Belgien). Der Vergleich zwischen der Kontroll- und mikrobiellen Reinigung wurde sowohl in der zeitlichen Abfolge als auch zwischen Bereichen mit identischer Infrastruktur innerhalb des jeweiligen Krankenhauses vorgenommen (z.B. zwei Geriatriestationen auf unterschiedlichen Etagen im AZ Lokeren Krankenhaus). Abgesehen von den Produkten stimmten alle anderen Parameter im Zusammenhang mit den Reinigungsverfahren (z.B. Häufigkeit, Ausstattung) zwischen der Kontroll- und der mikrobiellen Reinigung überein. Die Reinigung im AZ Lokeren Krankenhaus wurde gemäß dem vorhandenen Hygieneprotokoll des Krankenhauses vorgenommen. Die Reinigung in den beiden italienischen Krankenhäusern erfolgte im Einklang mit den Vorgaben des Probiotic Cleaning Hygiene System (PCHS) von Copma scril. Das Reinigungspersonal wusste nicht, ob es mit mikrobiellen Reinigungsprodukten arbeitete oder nicht.

Beschreibung der Krankenstationen

San Giorgio Rehabilitationskrankenhaus. Das San Giorgio Krankenhaus (Gesamtfläche 12.300 m²) ist ein Zentrum für die Rehabilitation von erworbenen schweren Erkrankungen mit Hirnschädigungen. Die in diese Studie einbezogenen Krankenstationen sind über insgesamt drei Etagen verteilt, wobei jede Etage (4.100 m²) aus zwei identischen, aber spiegelverkehrt aufgebauten Stationen bestehen, nämlich der Abteilung für Patienten mit schweren Hirnschädigungen und der Abteilung für Rehabilitationsmedizin. Diese beiden Stationen sind durch einen Mittelgang getrennt, und jede Station besteht aus 22 Aufwächerräumen (28 m²) mit zwei Betten und einer Toilette (4,2 m²). Zu den an diesem Versuchsort behandelten Oberflächen gehörten das Zimmer, der Korridor, die Böden und die Toiletten. Zusätzlich wurden auch in den sechs Sporträumen, die für die Rehabilitation der Patienten genutzt werden, Reinigungsmaßnahmen durchgeführt und Proben genommen.

Sant'Anna Universitätskrankenhaus. Die in die Studie einbezogenen Stationen im Sant'Anna Universitätskrankenhaus werden als allgemeinmedizinische Stationen für stationäre Patienten genutzt und bestehen aus zwei identischen Bereichen (S- und T-Bereich mit einer Oberfläche von jeweils 550 m²) und einer Ambulanz mit zwei Abteilungen für Augenheilkunde/ Kardiologie und Orthopädie (286 m² pro Abteilung, Raumgröße jeweils 22 m²). Die Aufwachräume (insgesamt 20 mit einer Oberfläche von jeweils 38 m²) und Toiletten (10 m²) wurden im Rahmen der mikrobiologischen Probenahme überwacht.

AZ Lokeren Hospital. Innerhalb des AZ Lokeren Krankenhauses wurden zwei strukturell identische Geriatrieabteilungen (500 m² pro Abteilung) in die Studie einbezogen. Auf den Stationen befinden sich ältere Menschen, die an einer großen Bandbreite verschiedener Krankheiten und pathologischer Zustände leiden, an denen chirurgische Eingriffe vorgenommen wurden, die Tagespflege erhalten und in einigen Fällen wegen Infektionen behandelt werden.

Mikrobiologische Untersuchungen

Die Wirkung von mikrobiellen und konventionellen Reinigungsprodukten auf TAI-assoziierte Mikroorganismen auf Oberflächen wurde durch die Entnahme von Oberflächenproben und anhand von kulturbasierten mikrobiologischen Tests beurteilt. Die folgenden TAI-assoziierten Mikroorganismen wurden überwacht: *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* in allen drei Krankenhäusern; *Clostridium spp.* im AZ Lokeren Krankenhaus; *Candida albicans* im Sant'Anna und San Giorgio Krankenhaus. Innerhalb eines Zeitraums von sechs Wochen im Sant'Anna Universitätskrankenhaus, 24 Wochen im AZ Lokeren Krankenhaus und 66 Wochen im San Giorgio Krankenhaus wurden insgesamt 20.000 mikrobiologische Proben (nach Ablauf von sechs bis acht Stunden nach der Reinigung) von verschiedensten Oberflächen z.B. Fußböden, Türen, Duschen, Fensterbrettern, Toiletten und Waschbecken aus Stein, Holz, Kunststoff, Glas oder Metall genommen.

Sämtliche Oberflächenproben wurden in Triplikaten mit Kontakt-RODAC-Platten (Replicate Organism Detection and Counting) genommen, die für die mikrobiologische Überwachung eines Teilbereiches der Oberfläche von 24 cm² genutzt werden. Die folgenden Wachstumsmedien wurden verwendet: McConkey Agar (BBL MacConkey Agar, BD) als selektives Differenzierungsmedium für den Nachweis und die Zählung von *Enterobacteriaceae* (insbesondere der Gruppe der coliformen Bakterien); Baird Parker Agar (Merck Millipore Baird-Parker Agar) als moderat selektives Differenzierungsmedium für den Nachweis und die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken sowie für den Nachweis von *Staphylococcus aureus*; Clostridium difficile agar (BBL Clostridium difficile Agar, BD) für den selektiven Nachweis von *Clostridium difficile* und Sabouraud Dextrose Contact Agar nach Anreicherung mit Chloramphenicol (Merck Millipore) als selektives Medium für den Nachweis und die Zählung von

Candida albicans. Die Inkubation wurde aerob bei einer Temperatur von 37°C (48 h–72 h) für MacConkey, Baird Parker, Cefrimide Agar und Sabouraud Dextrose Contact Agar und anaerob unter Verwendung von Anaerobietöpfen (GasPak, BD) bei einer Temperatur von 37°C (72 h) für Clostridium difficile agar vorgenommen. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) auf sämtlichen Agarplatten wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit manuell gezählt. Gelegentlich wurden Isolate von den o.g. Agarplatten identifiziert, um die Selektivität der verwendeten Medien zu überprüfen. Die Identifizierung der Isolate wurde mit Hilfe von API 20 E (bioMérieux, Inc, Durham, NC, USA) und BBL Enterotube II (BD Diagnostic Systems) für *Escherichia coli*, API Staph (bioMérieux, Inc) für *Staphylococcus aureus* und API 20 C Aux (bioMérieux, Inc) für *Candida albicans* vorgenommen.

Antibiogramme

Das verwendete Protokoll basierte auf dem Kirby-Bauer-Antibiotikaempfindlichkeits-Plattendiffusionstest [33–35] im Einklang mit den Kriterien des CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) [36,37]. Eine 90-mm-Mueller-Hinton-Agarplatte wurde kurz mit einer Suspension von *Bacillus subtilis*- (ATCC 6633) oder *Bacillus*-Stamm-Isolaten entsprechend dem 0.5-McFarland-Standard inokuliert. Nach 15 Minuten wurde eine mit einer bekannten Konzentration einer antimikrobiellen Lösung getränkte Papierscheibe (Oxoid Ltd., Thermo Scientific, Basingstoke, Hampshire, Großbritannien) hinzugefügt, danach wurden die Platten bei einer Temperatur von 37°C 24-48 Stunden inkubiert. Die Hemmhöfe (in mm) wurden gemessen. Die Interpretationen der Ergebnisse erfolgten auf Grundlage der CLSI-Referenzkriterien (Tabelle S1) [38].

Molekulare Analysen

Die Präsenz von antimikrobiellen Resistenzgenen in den gesammelten *Bacillus*-Isolaten wurde anhand der qualitativen Echtzeit-PCR-Methode (qPCR) beurteilt. Die mikrobielle genomische DNA wurde aus jedem Isolat mit Hilfe des QIAmp UCP Pathogen Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert, wobei die Herstellerangaben hinsichtlich der optimalen Lyse für gram-positive Bazillen und Sporen angepasst wurden. Zwei Mikrogramm der extrahierten DNA wurden durch das Mikrobielle-DNA-qPCR-Array für antibiotische Resistenzgene (QIAGEN, Hilden, Deutschland) analysiert, und zwar unter Verwendung eines Applied Biosystems 7300-Instrumentes und unter Einhaltung der Herstellerangaben. Die Analyse wurde an den ursprünglich in den Reinigungsprodukten vorhandenen Stämmen und an 20 verschiedenen Isolaten aus unterschiedlichen in die Studie einbezogenen Krankenhausumgebungen durchgeführt. Wasser ohne mikrobielle DNA (Qiagen) und eine Positivkontrolle mit mikrobieller DNA (Qiagen) wurden jeweils als Negativ- und Positivkontrollen verwendet. Außerdem wurde die DNA vom E.coli JM101-Stamm als Negativkontrolle eingesetzt. Die Vorversuche hatten gezeigt, dass die Empfindlichkeit des Analyseverfahrens etwa 10 Kopien jedes Zielgens entsprach.

Statistiken

Die statistische Analyse erfolgte auf Grundlage der allgemeinen linearen Modelle für wiederholte Messungen. Diese Methode kombiniert die wiederholten Messungen eines marginalen Modells mit dem allgemeinen linearen Modell für Residuen gemäß der Poissonschen Verteilung und dem Logarithmus als Link-Funktion. Die Vergleiche zwischen der Folgeuntersuchung und der Basalzeit wurden mit Hilfe der Wald-Statistik unter Anwendung der Sidak-Korrektur für mehrfache Vergleiche durchgeführt. Sämtliche statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS v 19.0 (IBM Corp., Armonk, New York, USA) vorgenommen.

Ergebnisse

Vor den Krankenhausuntersuchungen wurde eine ganze Reihe von In-vitro- und klein angelegten Feldversuchen durchgeführt, und zwar einerseits um die bestmöglichen Testprotokolle und Produktzusammensetzungen für die tatsächliche Studie zu identifizieren, und andererseits um den Ethik-Kommissionen relevante Informationen zur Verfügung stellen zu können. Der Schwerpunkt der Studie lag auf den mikrobiellen Zählungen, die tatsächliche Schmutzbeseitigung wurde nicht analysiert. Die Verwendung von *Bacillus*-Stämmen in den Reinigungsprodukten hatte einen weitaus höheren mikrobiologischen Einfluss auf harte Oberflächen als andere Gattungen (wie z.B. *Lactobacillus* und *Pseudomonas*), was hauptsächlich auf deren ausgeprägte Fähigkeit zur Sporenbildung zurückzuführen ist (Daten nicht enthalten). Auf Grundlage der durchschnittlichen Gesamtzählwerte einiger Arten von harten Oberflächen in Krankenhäusern wurde die optimale Konzentration der dem Produkt zuzusetzenden *Bacillus*-Sporen ermittelt. Vor Beginn der Krankenhausuntersuchungen legten wir fest, dass die Menge der Produktbakterien, die bei der Reinigung auf den Oberflächen verbleiben sollten, mengenmäßig dem durchschnittlichen Gesamtzählwert vor der Durchführung der mikrobiellen Reinigung entsprechen sollte. Eine Reihe von Labortests ergab, dass die gleichen Produktzusammensetzungen mit oder ohne Zugabe von *Bacillus*-Sporen einen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf die Pathogenbelastung der behandelten Oberflächen hatten.

Die Studie wurde in drei verschiedenen Krankenhäusern durchgeführt, und es wurden etwa 20.000 mikrobielle Oberflächenproben genommen. Die mikrobielle Analyse konzentrierte sich auf *Staphylococcus aureus*, coliforme Bakterien, *Clostridium difficile* sowie *Candida albicans* als Repräsentanten bzw. Indikatoren einer angemessenen Hygiene und TAI-assoziiierter Mikroorganismen. Um einen angemessenen Vergleich zwischen den verschiedenen Krankenhausumgebungen zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse als relative Werte dem jeweiligen Kontrollwert gegenübergestellt,

bei dem es sich um die ermittelte mikrobielle Oberflächenkontaminierung (KBE-Zahl) zu Beginn der Untersuchungen (Woche 0) handelt (siehe Tabellen S2, S3, S4 und S5).

Bemerkenswert ist, dass der Effekt der mikrobiellen Reinigung auf die unterschiedlichen, TAI-assoziierten Pathogene in allen drei untersuchten Krankenhäusern eine ähnliche Tendenz aufwies. Im Sant'Anna Universitätskrankenhaus erstreckte sich die mikrobielle Probenahme über sechs Wochen, wohingegen die anderen beiden Krankenhäuser bis Woche 24 (AZ Lokeren Krankenhaus) bzw. Woche 66 (San Giorgio Krankenhaus) überwacht wurden. Weil jedoch im San Giorgio Krankenhaus keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Zählungen zwischen Woche 24 und 66 beobachtet wurden, beschränken sich die hierin aufgeführten Daten auf einen Zeitraum von 24 Wochen. Während der Versuchsphase wurde auch die mikrobielle Gesamtzahl ermittelt. Es wurden jedoch keine signifikanten Veränderungen während des gesamten Untersuchungszeitraums in den Krankenhäusern festgestellt (Daten nicht enthalten).

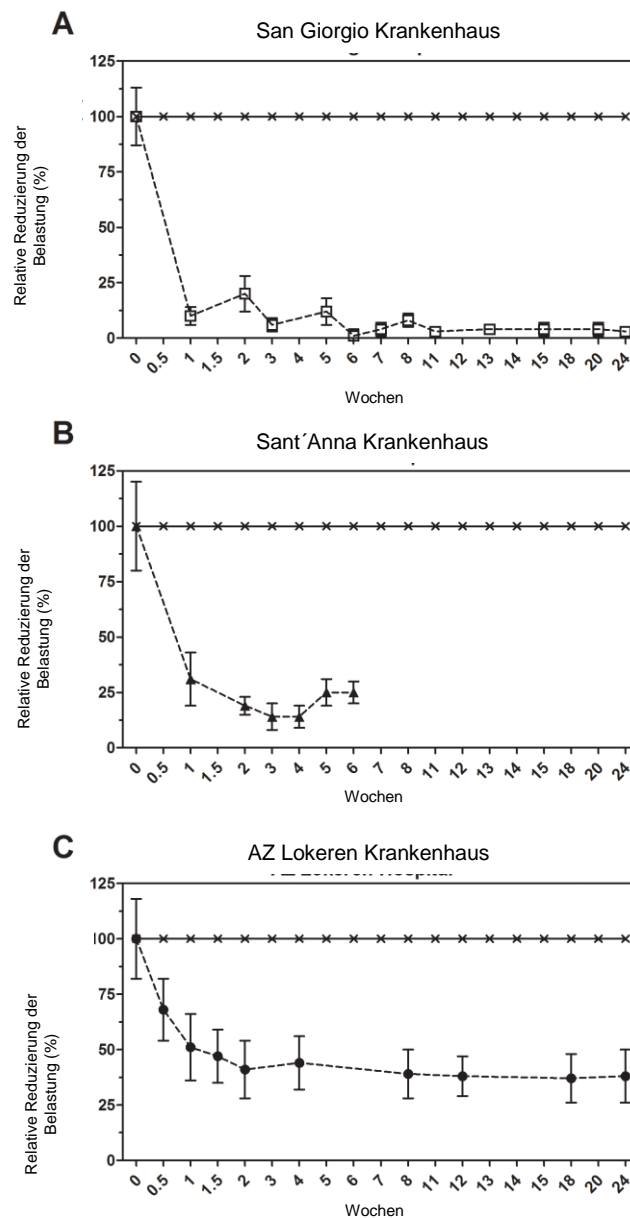


Abbildung 1. Auswirkungen der mikrobiellen Reinigung auf die Oberflächen-Zahl der coliformen Bakterien. Oberflächen-Zahl der coliformen Bakterien in den untersuchten Krankenhäusern San Giorgio (A), Sant'Anna (B) und AZ Lokeren (C). Die Ergebnisse sind als relativer Prozentwert der Reduzierung im Vergleich zur Kontrolle angegeben, welche mit konventionellen (desinfizierenden) Reinigungsprodukten behandelt wurde. Die Kontrolle wird durch den Wert der mikrobiellen Oberflächenkontamination (KBE-Zahl) zu Beginn des Versuchszeitraums (Woche 0) repräsentiert. Diese KBE-Zahl wurde als 100 % angesetzt, um einen verlässlichen Vergleich der drei strukturell unterschiedlichen Krankenhausumgebungen zu ermöglichen. Die Analyse ergab, dass die beobachteten Ergebnisse statistisch signifikant waren (Tabelle S2).
doi:10.1371/journal.pone.0108598.g001

Coliforme Bakterien und *E. coli*

Abbildung 1 enthält die durchschnittlichen relativen Werte der Belastung mit coliformen Bakterien, die als allgemeine Hygieneindikatoren fungieren. Die in Woche 1 für die coliformen Bakterien gemessenen Referenzwerte, wobei es sich bei etwa der Hälfte um *E. coli* handelt, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die individuellen Oberflächen-Zahlen können jedoch stark fluktuieren, und zwar insbesondere in bestimmten Bereichen wie Bädern oder geriatrischen Abteilungen. Bemerkenswert ist, dass der Beginn der mikrobiellen Reinigungsmaßnahmen zu einer schnellen Reduzierung der Anzahl der coliformen Bakterien und *E. coli* führte, wobei der maximale Effekt bei täglicher Reinigung nach etwa zwei Wochen erreicht wurde. Die durchschnittliche Reduzierung im zeitlichen Verlauf betrug 74 ± 21 % bei den coliformen Bakterien und 89 ± 18 % bei *E. coli*. Die beobachtete Reduzierung fiel in allen untersuchten Krankenhausumgebungen statistisch signifikant aus (Tabelle S2).

S. aureus

Die durchschnittlichen Vorkommen von *S. aureus* auf den untersuchten Oberflächen und die diesbezügliche prozentuale Reduzierung im zeitlichen Verlauf sind in Tabelle S3 bzw. in Abbildung 2 aufgeführt. Zur Klarstellung ist anzumerken, dass keine Unterscheidung in Bezug auf antibiotikaresistente oder antibiotikaempfindliche *S. aureus* vorgenommen wurde. Nach 10 Tagen mikrobieller Reinigung im San Giorgio Krankenhaus fiel die Anzahl von *S. aureus* auf den Oberflächen durchschnittlich um 58 ± 12 % und nach sechs Wochen um 78 ± 15 %, wobei die Reduzierung in allen untersuchten Krankenhausumgebungen hoch signifikant ausfiel (Tabelle S3). Sowohl bei der konventionellen als auch bei der mikrobiellen Reinigung blieb die *S. aureus*-Anzahl auf den behandelten Oberflächen recht stabil. Da es zu keinen großen Abweichungen während des gesamten Untersuchungszeitraums kam (Daten nicht enthalten), kann davon ausgegangen werden, dass dieser Organismus nicht sehr anfällig auf unterschiedliche Umweltbedingungen in einem Krankenhaus reagiert und daher unter den am häufigsten auftretenden Bedingungen überleben könnte.

C. difficile

Ein weniger häufig vorkommender, aber doch verbreiteter TAI-assoziiertes Organismus ist *Clostridium difficile*, dessen durchschnittliche Anzahl bei etwa 500 KBE/m^2 liegt (Tabelle S4), was sich nahe an der Detektionsgrenze der verwendeten Testprotokolle befindet. Die regelmäßige

Überwachung dieser Mikroorganismen erfolgte ausschließlich im AZ Lokeren Krankenhaus. *C. difficile* wies viel stärker ausgeprägte spezifische Zahlen auf verschiedenen Oberflächen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf, was in Kombination mit den insgesamt niedrigeren Durchschnittszahlen zu größeren Standardabweichungen führte, wodurch die Auswirkungen der mikrobiellen Reinigung im Vergleich zur Kontrolle kaum signifikant ausfielen. Die durchschnittliche Gesamtreduzierung der *C. difficile*-Last wurde sehr schnell, d.h. nach nur drei Tagen mikrobieller Reinigung erreicht, wobei die Reduzierung $55\pm 47\%$ entspricht (Abbildung 3). Weiterführende Messungen in den folgenden 24 Wochen zeigten, dass die *C. difficile*-Werte auf mikrobiell gereinigten Oberflächen unter die Detektionsgrenze der Analysemethoden fielen. Die beobachtete Reduzierung war in den Wochen 4 ($p = 0,048$) und 12 ($p = 0,007$) und insbesondere in den Wochen 18 ($p < 0,0005$) und 24 ($p = 0,004$) signifikant, was auf einen Langzeiteffekt der Reduzierung der *C. difficile*-Last hinweist.

C. albicans

Die *Candida albicans*-Last wurde ausschließlich in den beiden italienischen Krankenhäusern regelmäßig überwacht. Abbildung 4 zeigt die mittleren relativen Werte der Reduzierung der Belastung. Die durchschnittlichen Kontrollwerte für *C. albicans* sind in Tabelle S5 aufgeführt. Die mikrobielle Reinigung führte zu einer schnellen Reduzierung der Belastung, was einem Wert von $82\pm 19\%$ nach einer Woche entspricht. Bemerkenswert ist, dass die *C. albicans*-Last im Laufe der folgenden Wochen kontinuierlich auf niedrigem Niveau gehalten wurde. Ab Woche 2 lag die *C. albicans*-Zahl auf den mikrobiell gereinigten Oberflächen kaum noch oberhalb der Detektionsgrenze der Testprotokolle. Tatsächlich fiel die beobachtete Reduzierung in beiden Krankenhäusern hoch signifikant aus (Tabelle S5).

Zeitabhängige Untersuchung konventioneller und mikrobieller Reinigungsmethoden

Ein separates Experiment wurde in der geriatrischen Abteilung des AZ Lokeren Krankenhauses durchgeführt. Dabei wurden die konventionellen und mikrobiellen Reinigungsmaßnahmen abwechselnd angewendet und die bakterielle Last über einen Zeitraum von 10 Wochen überwacht. Die mikrobielle Reinigung (von Woche 0 bis Woche 2) wurde nach zwei Wochen konventioneller Reinigung (von Woche -2 bis Woche 0) durchgeführt, welche anschließend während eines weiteren Zeitraums von acht Wochen (von Woche 2 bis Woche 10) zur Anwendung kam. In Übereinstimmung mit den vorherigen Beobachtungen sorgte die mikrobielle Reinigung für eine starke Reduzierung der Belastung mit coliformen Bakterien und *S. aureus*, deren Anzahl von 9250 ± 1750 KBE/m² auf 3200 ± 1200 KBE/m² bzw. von 4200 ± 1200 KBE/m² auf 950 ± 450 KBE/m² nach jeweils 2 Wochen gefallen war. Im Gegensatz dazu erhöhten sich beide Belastungen nach dem Wechsel von der mikrobiellen Reinigung zur konventionellen Methode auf Koloniezahlen, die mit denen vergleichbar waren, die vor der Anwendung der mikrobiellen Reinigungsmethode ermittelt wurden (zwischen Woche -2 und 0) (Abbildung 5). Die Anwendung der mikrobiellen Reinigungsmethode führte zu einem

signifikanten Rückgang der pathogenen Belastung mit coliformen Bakterien ($p < 0,0001$, von Woche 0,5 bis Woche 3) und *S. aureus* ($p = 0,003$, von Woche 1 bis Woche 3) im Vergleich zu den Messungen in Woche 0. Nach dem Wechsel von der mikrobiellen Reinigung zur konventionellen Reinigungsmethode wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Insgesamt wiesen unsere Daten nach der mikrobiellen Reinigung darauf hin, dass die starke Reduzierung der Pathogenlast über den gesamten Zeitraum stabil gehalten wurde, und dass der beobachtete Effekt in direktem Zusammenhang mit der Anwendung der mikrobiellen Reinigungsmethode stand, was durch den Vergleich mit der konventionellen Reinigungsmethode verdeutlicht wurde.

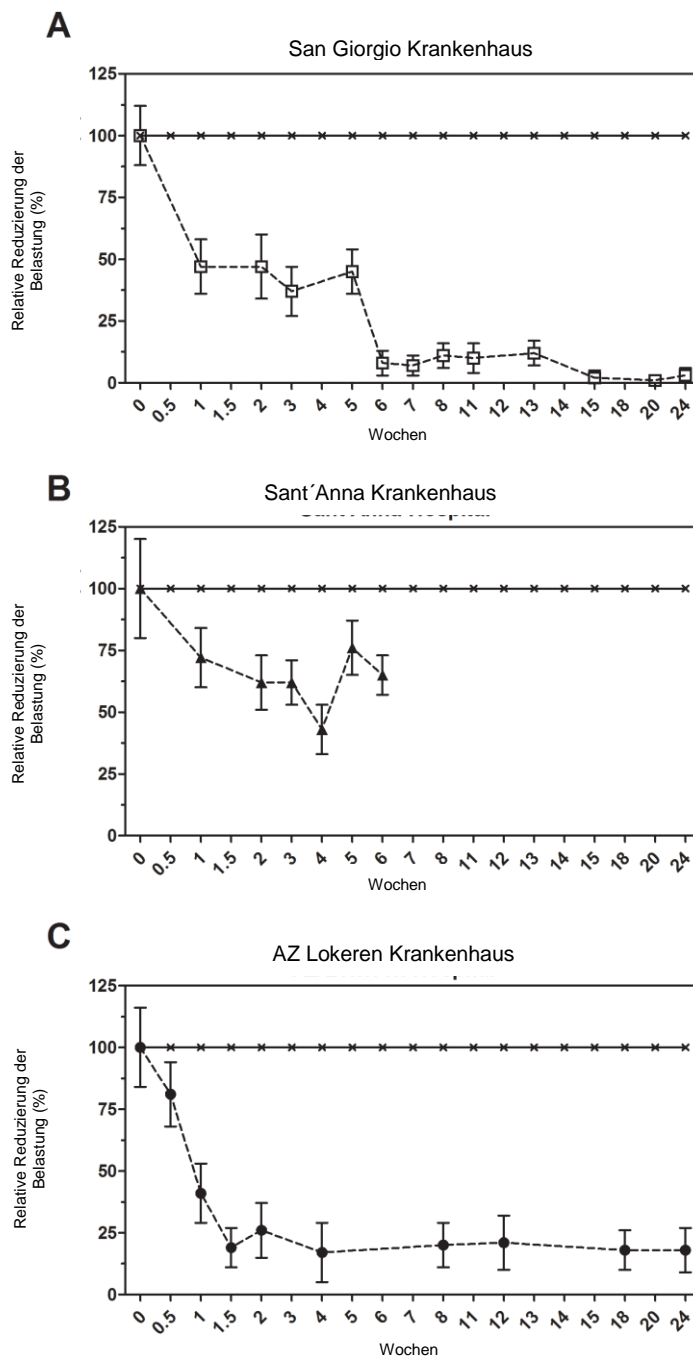


Abbildung 2. Auswirkungen der mikrobiellen Reinigung auf die Oberflächen-Zahl von *S. aureus*. Oberflächen-Zahl von *S. aureus* in den untersuchten Krankenhäusern San Giorgio (A), Sant'Anna (B) und AZ Lokeren (C). Die Ergebnisse sind als relativer Prozentwert der Reduzierung im Vergleich zur Kontrolle angegeben, welche mit konventionellen (desinfizierenden) Reinigungsprodukten behandelt wurde. Die Analyse ergab, dass die beobachteten Ergebnisse statistisch signifikant waren (Tabelle S3). doi:10.1371/journal.pone.0108598.g002

Antibiotika-Empfindlichkeit/ -Resistenz der *Bacillus*-Isolate

Um das Auftreten von antimikrobiellen Resistenzen in den *Bacillus*-Stämmen untersuchen zu können, führten wir sowohl konventionelle Antibiogramme als auch molekulare Analysen von *Bacillus*-Isolaten durch, die von den behandelten Oberflächen entnommen worden waren. Die im Vorfeld gewonnenen Erkenntnisse aus den Antibigrammen zeigten, dass die untersuchten Bacilli, die sowohl von den PCHS-Produkten als auch von den Isolaten stammten, die bekannte natürliche Penicillin-Resistenz aufwiesen. Das Empfindlichkeitsprofil der anderen untersuchten Antibiotika (Cefoperazon, Cefalotin und Gentamicin) war mit dem des ATCC-Referenzstammes vergleichbar. Die einzige Ausnahme bildete Clindamycin, da bei diesem Antibiotikum intermediäre Werte beobachtet wurden (Tabelle 1).

Um die Anzahl der analysierten antimikrobiellen Resistenzfaktoren zu erhöhen, wurden 20 *Bacillus*-Isolate, die ab dem 6. bis zum 12. Monat nach Beginn der Krankenhausuntersuchungen entnommen worden waren, zusätzlich mit Hilfe einer qPCR-Methode analysiert, mit der 87 verschiedene, mit einer Antibiotikaresistenz assoziierte Gene nachgewiesen werden können. Vor der Untersuchung der *Bacillus*-Isolate wurde die Methode an bekannten *Bacillus spp.*-DNA-Proben erprobt, wodurch nachgewiesen wurde, dass diese Technik ein verlässliches Instrument für die nachfolgenden Analysen darstellt.

Die Analyse der Reinigungsprodukte auf probiotischer Basis bewies die Existenz von konstitutiven Resistenzgenen in den *Bacillus*-Spezies, welche in der Original-Produktzusammensetzung enthalten waren, was die Erkenntnisse aus früheren Publikationen untermauerte (Abbildung 6).

Bemerkenswerterweise waren keinerlei neue oder erworbene Resistenzgene in den untersuchten *Bacillus*-Isolaten vorhanden, was darauf hindeutet, dass bei diesen Bakterien selbst nach 12-monatiger Anwendung weder Mutagenitäts- noch Gentransferereignisse stattgefunden hatten, wodurch die in den Antibigramm-Analysen beobachteten Ergebnisse bestätigt wurden.

Diskussion

In Anbetracht der neuesten Berichte zur TAI-Prävalenz [3] und der Entwicklung von mikrobiellen Resistenzen gegenüber Antibiotika [39] und Desinfektionsmitteln [20] wird deutlich, dass neue und nachhaltige Strategien für den Umgang mit kontaminierten Oberflächen in Krankenhausumgebungen von größter Bedeutung sind. Neben der Übertragung von Pathogenen von Mensch zu Mensch stellen kontaminierte Oberflächen in der Umgebung eine wesentliche potenzielle Quelle für die Übertragung einer Vielzahl von therapieassoziierten Pathogenen dar,

was auf deren Überlebensfähigkeit auf derartigen unbelebten Flächen zurückzuführen ist [9,10,40]. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung von Reinigungsmethoden, die auf die Kontrolle der pathogenen Bakterienlast auf Krankenhausoberflächen und somit auf die Kontrolle von TAI ausgerichtet sind, wobei bereits beträchtliche Beweise für den vorteilhaften Effekt der Krankenhaushygiene in Bezug auf die TAI-Reduzierung vorliegen [18].

Diese Studie folgte der Hypothese von Falagas & Makris [22] bezüglich der Verwendung von nicht-pathogenen Mikroorganismen (Probiotika) als Bestandteil täglich genutzter Reinigungsprodukte zur Verringerung der Inzidenz von TAI-assoziierten Mikroorganismen in Einrichtungen des Gesundheitswesens. Belege für die Wirksamkeit von Probiotika bei der Prävention und Behandlung von Infektionen konnten bereits *in vitro* und *in vivo* gefunden werden [41–43].

Es existiert eine große Vielfalt an TAI-assoziierten Mikroorganismen. Für die Zwecke dieser Studie erfolgte die Auswahl hauptsächlich anhand der Relevanz und relativen Häufigkeit der Mikroorganismen in den Krankenhäusern, die sich zur Teilnahme an der Studie bereit erklärt hatten. Coliforme Bakterien wurden als Indikatoren für die Beurteilung der allgemeinen Hygiene und der Reinigungsmaßnahmen ausgewählt. Obwohl einige TAI mit Ausbrüchen assoziiert sind und andere eine ziemlich konstante Prävalenz zeigen, können die assoziierten Mikroorganismen jederzeit auf harten Oberflächen gefunden werden, wie im Rahmen dieser Studie bewiesen wurde. Das deutet darauf hin, dass Oberflächen als Reservoirs fungieren, die einen Ausbruch auslösen können, sobald Menschen kontaminiert werden und die Verbreitung der Pathogene von Mensch zu Mensch beginnt.

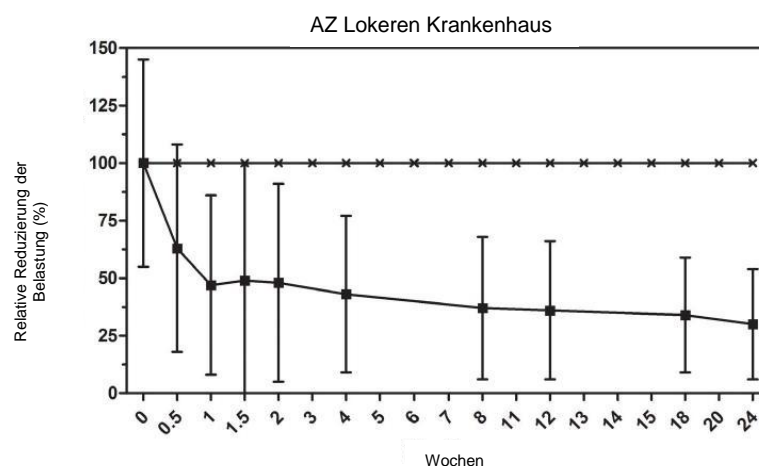


Abbildung 3. Auswirkungen der mikrobiellen Reinigung auf die Oberflächen-Zahl von *C. difficile*. Die Oberflächen-Zahl ist als relativer Prozentwert der Reduzierung im Vergleich zur Kontrolle angegeben, welche mit konventionellen (desinfizierenden) Reinigungsprodukten behandelt wurde. Die statistische Analyse ist in Tabelle S4 enthalten. doi:10.1371/journal.pone.0108598.g003

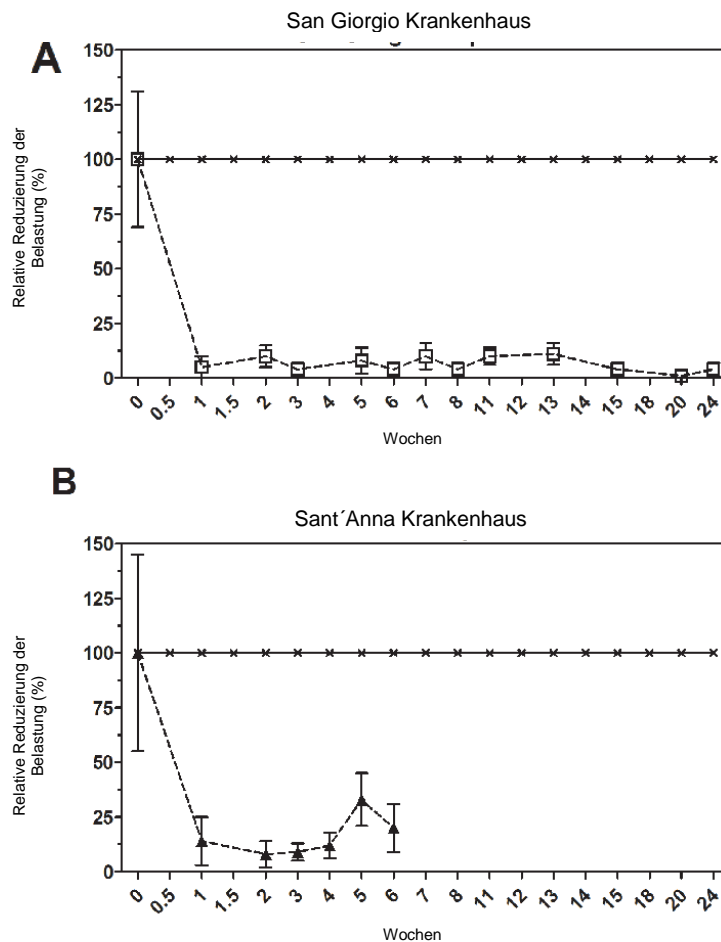


Abbildung 4. Auswirkungen der mikrobiellen Reinigung auf die Oberflächen-Zahl von *Candida albicans*. Die Oberflächen-Zahl ist als relativer Prozentwert der Reduzierung im Vergleich zur Kontrolle angegeben, die mit konventionellen (desinfizierenden) Reinigungsprodukten behandelt wurde. Die Analyse ergab, dass die beobachteten Ergebnisse statistisch signifikant waren (Tabelle S5).
doi:10.1371/journal.pone.0108598.g004

Das Ziel dieser Studie bestand in der Sammlung einer großen Datenmenge in verschiedenen Einrichtungen des Gesundheitswesens. Die 20.000 mikrobiellen Oberflächenproben sollten für die Signifikanz der Ergebnisse sorgen. Durch die Vielzahl der Analysen war es jedoch nicht möglich, sämtliche spezifischen Daten und Beobachtungen im Rahmen dieser Studie zu präsentieren. Wegen den ziemlich ähnlich ausgefallenen durchschnittlichen mikrobiellen Zählungen in den verschiedenen Krankenhäusern lag der Fokus der hierin präsentierten Daten auf den beobachteten Oberflächenmikrobiologie-Tendenzen unter Anwendung mikrobieller Reinigungsmethoden.

Im Allgemeinen war zu beobachten, dass die mikrobielle Reinigung von harten Oberflächen innerhalb von zwei Wochen zu einer deutlichen Veränderung der Mikrobiologie führte. Mit Ausnahme von *Clostridium difficile* konnte ein hoch signifikanter Rückgang der TAI-assoziierten Mikroorganismen im Vergleich zur konventionellen Reinigung und Desinfektion beobachtet werden. Nach zwei Wochen mikrobieller Reinigung blieb die reduzierte Anzahl der TAI-assoziierten Mikroorganismen konstant und meistens nur noch knapp oberhalb der

Detektionsgrenze des Testprotokolls. Die Standardabweichung einiger Werte war hoch (wahrscheinlich aufgrund der großen Unterschiede hinsichtlich der Art der untersuchten Oberflächen), aber die Differenz war trotzdem signifikant genug, um die Wirkung der mikrobiellen Reinigung im Vergleich zur Kontrolle zu verdeutlichen. Unsere Ergebnisse belegen, dass die mikrobielle Reinigung offensichtlich zur Verringerung der Präsenz von TAI-assoziierten Mikroorganismen auf harten Oberflächen im Vergleich zur konventionellen Reinigung führte, ohne die mikrobielle Gesamtzahl signifikant zu senken. Außerdem zeigen unsere Daten, dass bei einem Wechsel von der mikrobiellen zur konventionellen Reinigungsmethode die TAI-assoziierten Mikroorganismenzahlen auf die (höheren) Ausgangswerte stiegen, d.h. die Werte, die vor Beginn der mikrobiellen Reinigung ermittelt wurden. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die mikrobielle Reinigung eine zeitlich begrenzte Wirkung auf die Anzahl der TAI-assoziierten Mikroorganismen hat, und dass eine mikrobielle Reinigung kontinuierlich und auf regelmäßiger Basis erfolgen muss, um die reduzierten Vorkommen dieser Mikroorganismen stabil halten zu können. Die mikrobielle Reinigung führte daher zu einer teilweisen, nicht dauerhaften Ersetzung TAI-assoziiertter Mikroorganismen durch die in den mikrobiellen Reinigungsprodukten enthaltenen *Bacillus*-Stämme.

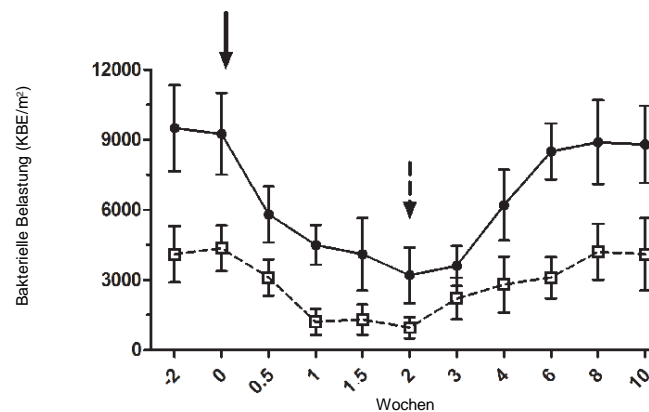


Abbildung 5. Zeitlicher Verlauf der Oberflächen-Zahl der coliformen Bakterien und *S. aureus*. Eine zeitabhängige Studie in Bezug auf die Anzahl der coliformen Bakterien (schwarze Kreise) und *S. aureus* (weiße Kästchen) wurde in der geriatrischen Abteilung des AZ Lokeren Krankenhauses durchgeführt. Die Oberflächen-Zahl, die in KBE/m² angegeben ist, wurde nach der Anwendung der konventionellen (von Woche -2 bis 0) und der mikrobiellen (von Woche 0 bis 2) Reinigungsmethode ermittelt, die in der folgenden Periode wieder durch die konventionelle Reinigungsmethode abgelöst wurde (von Woche 2 bis 10). Die Anwendung der Produkte auf probiotischer Basis führte zu einem signifikanten Rückgang der pathogenen Last in Form von coliformen Bakterien ($p < 0,0001$) und *S. aureus* ($p = 0,003$). Schwarzer Pfeil: Beginn der mikrobiellen Reinigung. Gestrichelter schwarzer Pfeil: Konventionelle Reinigung. doi:10.1371/journal.pone.0108598.g005

Obwohl das Ziel dieser Studie nicht in der Erforschung der den Mikrobiotaveränderungen auf den Oberflächen zugrundeliegenden Mechanismen bestand, können auf Grundlage der existierenden Literatur einige Vermutungen angestellt werden. Die relevantesten Mechanismen, die dem beobachteten Effekt zugrundeliegen, sind wahrscheinlich auf das Konkurrenzausschlussprinzip zurückzuführen: *Bacillus*-Stämme, die mit der Reinigungslösung auf die Oberflächen aufgebracht werden, können in Bezug auf Nahrung und Platz mit der Mikrobiota konkurrieren, die sich bereits auf den Oberflächen befindet [44]. Woo & Ahn wiesen darauf hin, dass der Konkurrenzausschluss zudem bestimmte Biofilme destabilisieren kann [44], was in der vorliegenden Studie in Form der Beseitigung von Belägen auf bestimmten harten Oberflächen nach einigen Wochen mikrobieller

Reinigung beobachtet werden konnte. Diese Biofilmbeseitigung auf harten Oberflächen durch die Anwendung mikrobieller Reinigungsmethoden sollte noch näher erforscht werden. Weitere Mechanismen, die zur Mikrobiotabiotaveränderung beitragen und die Biofilmbildung destabilisieren können, sind die mikrobiellen Kommunikations- (Quorum sensing) und Inhibitionsmechanismen (Quorum quenching) [45]. Die konstante künstliche Zuführung einer dominanten Anzahl von *Bacillus spp.* durch die Reinigungsprodukte könnte die mikrobielle Populationsdynamik auf Oberflächen und in Biofilmen destabilisieren (z.B. Beläge).

Tabelle 1. Antibiogramme für *Bacillus spp.* aus den Reinigungsprodukten und Isolaten

	Zonendurchmesser-Interpretationskriterien (mm)				
	Betalaktame			Aminoglykoside	Lincosamide
	Penicillin	Cefoperazon	Cefalotin	Gentamicin	Clindamycin
	(10 µg)	(30 µg)	(30 µg)	(10 µg)	(2 µg)
ATCC 6633	7 R ^a	20 I ^b	30 E	25 E	25 E
PCHS-Produkt	14 R	19 I	24 E	24 E	18 I
<i>Bacillus spp.</i> Isolat 1	12 R	19 I	20 E	25 E	20 I
<i>Bacillus spp.</i> Isolat 2	15 R	20 I	30 E	25 E	16 I
<i>Bacillus spp.</i> Isolat 3	10 R	30 E ^c	35 E	30 E	25 E

^aresistent

^bintermediär

^cempfindlich

Hinweis: Die Referenzkriterien sind in Tabelle S1 aufgeführt.

Die Antibiogramme wurden an Bacilli aus den PCHS-Produkten und Isolaten durchgeführt, der ATCC 6633-Stamm diente als Referenz.

Die Ergebnisse sind als Durchmesser (in mm) der Hemmhöfe sowie im Einklang mit den CLSI-Referenzkriterien in Form der Interpretationskriterien angegeben [38] (Tabelle S1).

doi:10.1371/journal.pone.0108598.t001

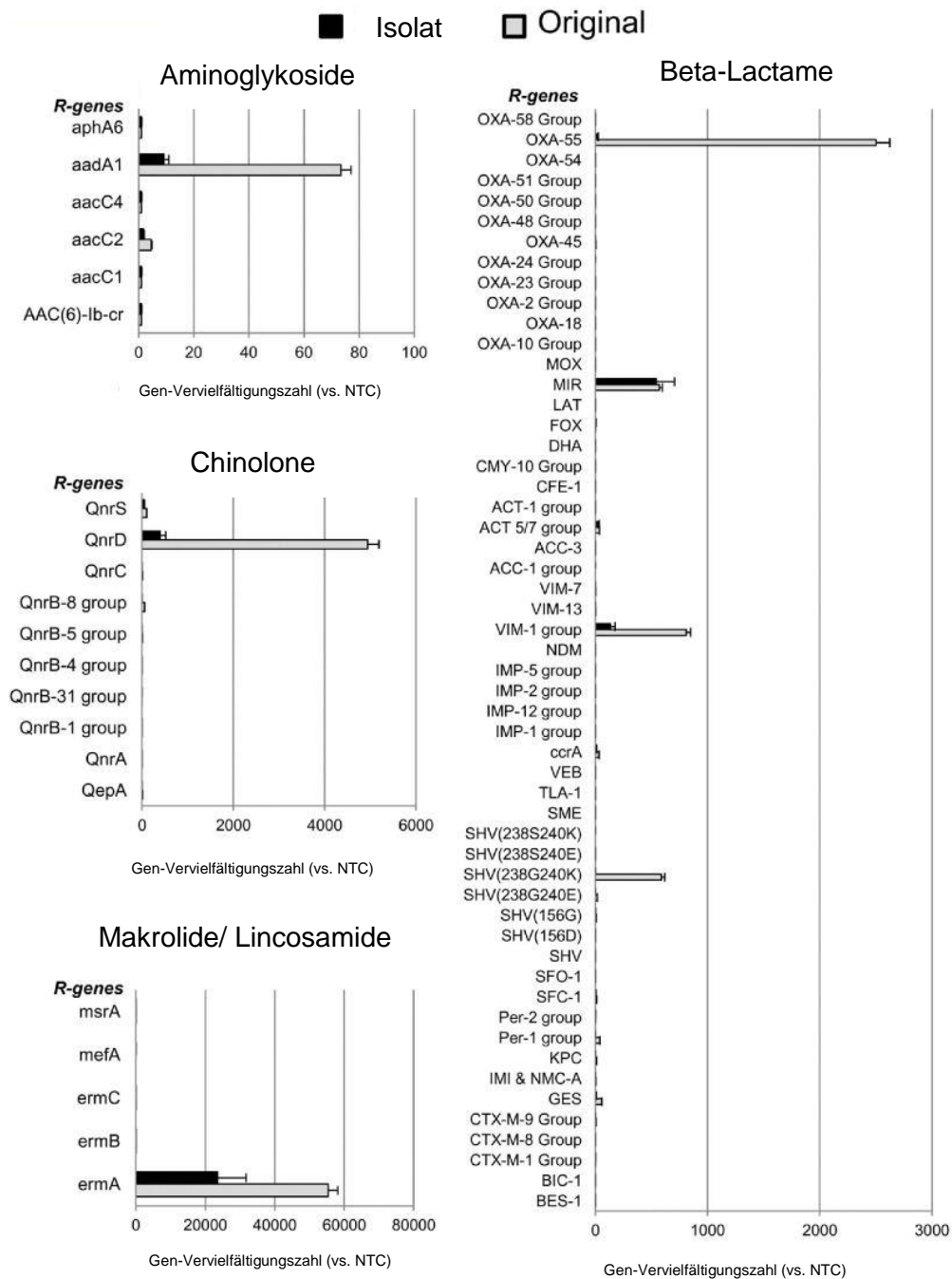


Abbildung 6. Antibiotikaresistenzgenprofile gemäß qPCR-Analyse. Die DNA der *Bacillus spp.* aus den Reinigungsprodukten (Original) und 20 *Bacillus spp.*-Kolonien, die von den behandelten Oberflächen in einem Zeitraum von bis zu 12 Monaten nach Beginn des Reinigungsprotokolls isoliert wurden (Isolate) wurde mit Hilfe der qPCR-Mikroarray-Methode analysiert, um die Präsenz von Antibiotikaresistenzgenen nachzuweisen (R-Gene). Die DNA des *E. coli* JM101-Stammes wurde als Negativkontrolle (NTC) verwendet. Die Ergebnisse sind als Vielfaches der Anzahl der Genkopien angegeben, wobei die ermittelten Werte mit denen der Negativkontroll-DNA verglichen wurden, nachdem beide Werte im Hinblick auf die Anzahl der Bakterienzellen normalisiert worden waren. Die Gene, die die Resistenz von in der Abbildung nicht aufgeführten Antibiotika definieren (d.h. Vancomycin, Tetracykline) waren sowohl im Original als auch in den gesammelten Isolaten negativ. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.
doi:10.1371/journal.pone.0108598.g006

In Anbetracht des beobachteten allgemeinen Effektes der mikrobiellen Reinigung auf diverse TAI-assoziierte Mikroorganismen ist es wahrscheinlich, dass nicht-selektive Effekte wie der Konkurrenzausschluss und der mikrobielle Kommunikationsmechanismus (Quorum sensing) die wichtigsten beteiligten Faktoren sind. Neben diesen allgemeinen Mechanismen könnten auch

andere spezifische Interaktionen zur Reduzierung von einem oder mehreren TAI-assoziierten Mikroorganismen beitragen. Beispielsweise kann die Produktion von Bakteriozinen [46] oder einigen Enzymen, die bekanntermaßen durch *Bacillus spp.* produziert werden, andere Organismen in größerem Maße beeinflussen. In Bezug auf *Clostridium* weisen die Autoren darauf hin, dass die kortexlytischen Enzyme, die in die Keimung der *Bacillus*-Sporen involviert sind [47], bei der Verwendung in mikrobiellen Reinigungsprodukten auch die Keimung von *Clostridium*-Sporen auf Oberflächen auslösen könnten. Die gekeimten *Clostridium*-Zellen könnten daraufhin durch Sauerstoffkontakt abgetötet werden oder dem Konkurrenzausschluss anheimfallen. Unabhängig von den tatsächlich beteiligten Mechanismen zeigt diese Studie, dass die mikrobielle Reinigung in Einrichtungen des Gesundheitswesens in der Lage ist, die Oberflächen-Zahlen einer Vielzahl von TAI-assoziierten Mikroorganismen signifikant zu reduzieren.

Die wichtigste Frage betrifft die Sicherheit des Einsatzes von mikrobiellen Reinigungsmethoden als Biokontrollsystem in Einrichtungen des Gesundheitswesens. Selbstverständlich ist die Identifizierung und Beurteilung der Sicherheit der in den Produkten enthaltenen Bakterienstämme von größter Wichtigkeit, was auch auf die Produktionsabläufe in der gesamten Herstellungskette zutrifft. Bei den in dieser Studie verwendeten Bakterienstämmen (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* und *Bacillus megaterium*) handelt es sich um Organismen in Nahrungsmittelqualität, für die aussagekräftige Herstellerinformationen zur Sicherheit und Toxizität zur Verfügung stehen und von denen allgemein bekannt ist, dass sie keine schädliche Wirkung auf den Menschen ausüben [48–51]. Zudem sind sämtliche Produktions- und Qualitätskontrollprozesse gemäß ISO9001:2008 zertifiziert. Des Weiteren wurde die Verwendung von Probiotika in diversen biotechnologischen und biopharmazeutischen Anwendungen, wie z.B. beim kürzlichen Einsatz von *B. subtilis* als Biokontrollagent in der Aquakultur [52] und Landwirtschaft [53–55] sowie als Hilfsstoff [56,57] oder (in Sporenform) als Verabreichungssystem für neuartige Impfungen [58–63] bereits im Rahmen von Studien untersucht und kontrolliert.

Dennoch ist festzustellen, dass die mikrobielle Reinigung allein das aufstrebende TAI-Problem nicht lösen wird. Es gibt aussagekräftige Beweise dafür, dass ein ordnungsgemäßes Handhygieneprogramm im medizinischen Umfeld ein effektives Verhalten im Hinblick auf die Reduzierung von TAI darstellt [64,65]. Daher sollte die mikrobielle Reinigung in das Gesamthygieneprotokoll einbezogen werden, wie es z.B. beim im Rahmen dieser Studie verwendeten PCHS-System (Proposed Microbial Cleaning System) der Fall ist. Derartige Protokolle enthalten Angaben zu den Bereichen und Ereignissen, bei denen eine angemessene Desinfektion der mikrobiellen Reinigung vorzuziehen ist, sowie Hinweise zur ordnungsgemäßen Handhygiene bzw. Isolation von kontaminierten Personen. Auch sporadische Ausbrüche (z.B. von Virusinfekten) könnten besondere Maßnahmen erfordern, die nicht dem routinemäßigen Reinigungs- oder Desinfektionsprotokoll entsprechen. Trotz der reduzierenden Wirkung auf diverse TAI-assoziierte Mikroorganismen werden mikrobielle Reinigungsprodukte nicht als Desinfektionsmittel verwendet oder betrachtet. Selbstverständlich muss eine aktiv kontaminierte Oberfläche desinfiziert werden, das trifft insbesondere auf Oberflächen zu, die sich in

Hochrisikobereichen befinden. Durch die Verwendung von Produkten auf Probiotikabasis kann die begrenzte Wirkung von traditionellen Desinfektionsmitteln erweitert werden, indem mit Hilfe der mikrobiellen Produkte das Risiko eines erneuten Auftretens von pathogenen Belastungen auf Oberflächen verringert wird und Biofilme entfernt werden, die anderen Pathogenen Raum bieten könnten. Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Produkte auf Probiotikabasis sind nur für die Reinigung geeignet, daher müssen bei Desinfektionsbedarf selbstverständlich Desinfektionsmittel verwendet werden, die Kombination mit Reinigungsmethoden auf Probiotikabasis ermöglicht jedoch eine optimale langfristige Aufrechterhaltung von niedrigen Kontaminationsgraden.

Um die Empfindlichkeit bzw. Resistenz der *Bacillus*-Stämme gegenüber Antibiotika zu beurteilen, haben wir vor kurzem unsere Studienergebnisse für Antibiotogramm-Untersuchungen genutzt, die an *Bacillus spp.*-Kolonien durchgeführt wurden, welche von ein und denselben Probeoberflächen (z.B. Fußböden) stammen, die im Rahmen der Krankenhausuntersuchungen überwacht wurden. Unsere ersten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die isolierten *Bacillus spp.*-Stämme empfindlich auf die untersuchten Antibiotika reagieren, mit Ausnahme der Antibiotika, gegenüber denen *Bacillus spp.* natürliche Resistenzen aufweist, was auch durch die Antibiotogramme verdeutlicht wird, die am Standard-ATCC-Stamm durchgeführt wurden.

Wir sind uns der Tatsache bewusst, dass sich diese Studie auf eine begrenzte Anzahl von Mikroorganismen beschränkt, und dass kulturabhängige Techniken einige Einschränkungen aufweisen, da Einzelkolonien eventuell nicht vollständig repräsentativ für die analysierte Bakteriengattung sein können. Was die Sicherheitsbedenken betrifft, so wurden zur Erhöhung des repräsentativen Charakters der Ergebnisse 20 *Bacillus*-Isolate ebenfalls anhand der qPCR-Methode untersucht, die dafür ausgelegt ist, die Präsenz von 87 verschiedenen Resistenzgenen simultan zu beurteilen. Neben der großen Anzahl der analysierten Resistenzfaktoren besitzt diese Methode eine hohe Sensitivität, die das Auffinden von sehr wenigen Kopien eines Zielgens erlaubt, wodurch die Identifizierung von Antibiotikaresistenzgenen auch in Fällen möglich ist, in denen nur eine sehr geringe Anzahl bakterieller Zellen innerhalb einer Probe positiv auf Antibiotikaresistenz getestet wird. Die Verlässlichkeit dieser Methode zur Analyse von *Bacillus*-Stämmen wird durch den erwartungsgemäßen Nachweis der bekanntlich in den *Bacillus spp.* vorkommenden Resistenzgene untermauert, welche in dem verwendeten Reinigungsprodukt enthalten sind [66].

Obwohl diese Analysen lediglich an 20 *Bacillus spp.*-Isolaten durchgeführt wurden, zeigten die Zwischenergebnisse, dass sich im Laufe von 12 Monaten keine neuen Resistenzgene gebildet hatten, wodurch die Hypothese unterstützt wird, dass die Verwendung von *Bacillus*-Sporen in Reinigungsprodukten als sicher angesehen werden kann. Zudem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei dieser Analyseverfahren um eine verlässliche Möglichkeit zur Beurteilung von antimikrobiellen Resistenzfaktoren in *Bacillus*-Stämmen handelt, sodass sie auch in künftigen Studien Anwendung finden könnte, bei denen Sicherheitsbedenken im Vordergrund stehen.

Schlussfolgerungen

In Anbetracht der aktuellen rasanten Entwicklung von multiresistenten Pathogenen in Einrichtungen des Gesundheitswesens besteht ein Bedarf für nachhaltige und effektive Alternativen zu den heute verwendeten Reinigungs- und Desinfektionschemikalien. Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass eine mikrobielle (auf Probiotika basierende) Reinigung hinsichtlich der langfristigen Senkung der Anzahl TAI-assoziiierter Mikroorganismen auf Oberflächen wirksamer als konventionelle Reinigungsprodukte ist, selbst wenn diese desinfizierende Moleküle wie Chlor enthalten. Die bisherigen Ergebnisse in Bezug auf die prozentualen TAI-Werte in den im Rahmen der Studie kontinuierlich untersuchten Krankenhäusern sind sehr vielversprechend und könnten den Weg für eine neuartige und kosteneffektive Strategie zur Bekämpfung bzw. (Bio)kontrolle therapieassoziiierter Pathogene bereiten.

Bezüglich des Risikomanagements muss entschieden werden, ob ein Patient sich in einer Umgebung aufhalten sollte, die von Mikroorganismen in Lebensmittelqualität dominiert ist, oder in einem Umfeld mit stark erhöhten Vorkommen von zunehmend resistenten Pathogenen.

Ergänzende Informationen

Tabelle S1 Referenzkriterien für die Interpretation der Hemmhöfe im Antibiotikaempfindlichkeits-Plattendiffusionstest. Die Tabelle zeigt die Interpretationskriterien beim Plattendiffusionstest hinsichtlich der Korrelation des Durchmessers (in mm) der Hemmhöfe mit den entsprechenden Interpretationen, wobei die Klassifizierung als empfindlich (E), intermediär (I) und resistent (R) entsprechend den CLSI-Referenzkriterien erfolgt ist [38]. (XLSX)

Tabelle S2 Statistische Analyse der Reduzierung der Belastung mit coliformen Bakterien. Die Ergebnisse sind in KBE/m² angegeben. (XLSX)

Tabelle S3 Statistische Analyse der Reduzierung der Belastung mit Staphylococcus aureus. Die Ergebnisse sind in KBE/m² angegeben. (XLSX)

Tabelle S4 Statistische Analyse der Reduzierung der Belastung mit Clostridium difficile. Die Ergebnisse sind in KBE/m² angegeben. (XLSX)

Tabelle S5 Statistische Analyse der Reduzierung der Belastung mit Candida albicans. Die Ergebnisse sind in KBE/m² angegeben. (XLSX)

Beiträge der Autoren

Konzipierung und Planung der Experimente: RT PA PGB EC SM. Durchführung der Experimente: AV RT AF EC. Analyse der Daten: SM RT AF EC DP AB. Bereitstellung von Reagenzien/ Materialien/ Analysewerkzeugen: SM AV AF EC. Verfassen des Artikels: RT AB DP EC SM.

Literaturverzeichnis

1. Burke JP (2003) Infection control - a problem for patient safety. *N Engl J Med* 348: 651–656.
2. Allegranzi B, Nejad SB, Castillejos GG, Kilpatrick C, Kelley E, et al Clean Care is Safer Care Team (2011) Report on the Burden of Endemic Health Care–Associated Infection Worldwide. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Verfügbar unter: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501507_eng.pdf
3. Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Diaz Högberg L (2013) Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control. Verfügbar unter: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-usepps.pdf>.
4. Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Jr., Horan TC, Gaynes RP, et al. (2007) Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep* 122: 160–166.
5. Scott D (2009) The direct medical costs of Healthcare-Associated Infections in U.S. Hospitals and the benefits of prevention. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Available: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott_costpaper.pdf.
6. Davis GS, Sevdalis N, Drumright LN (2014) Spatial and temporal analyses to investigate infectious disease transmission within healthcare settings. *J Hosp Infect* 86: 227–243.
7. Gaudart J, Cloutman-Green E, Guillas S, D’Arcy N, Hartley JC, et al. (2013) Healthcare environments and spatial variability of healthcare associated infection risk: cross-sectional surveys. *PLoS One* 8: e76249.
8. Hota B (2004) Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis* 39: 1182–1189.
9. Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6: 130.
10. Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL (2013) 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* 41: S6–11.
11. Rutala WA, Weber DJ (2005) The benefits of surface disinfection. *Am J Infect Control* 33: 434–435.
12. Dettenkofer M, Spencer RC (2007) Importance of environmental decontamination—a critical view. *J Hosp Infect* 65 Suppl 2: 55–57.
13. Rutala WA (1996) APIC guideline for selection and use of disinfectants. 1994, 1995, and 1996 APIC Guidelines Committee. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. *Am J Infect Control* 24: 313–342.
14. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR (1999) Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20: 250–278.
15. WHO/CDS/CSR/EPH. Prevention of Hospital-acquired infections; a practical guide. Vol. 12, 2002.
16. Sehulster L, Chinn RY, Cdc, Hicpac (2003) Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep* 52: 1–42.
17. Rutala WA, Weber DJ, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008) Guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities. http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/toc.html. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
18. Dancer SJ (2009) The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect* 73: 378–385.
19. Weber DJ, Rutala WA (2013) Assessing the risk of disease transmission to patients when there is a failure to follow recommended disinfection and sterilization guidelines. *Am J Infect Control* 41: S67–71.
20. McDonnell G, Russell AD (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12: 147–179.
21. Frabetti A, Vandini A, Balboni P, Triolo F, Mazzacane S (2009) Experimental evaluation of the efficacy of sanitation procedures in operating rooms. *Am J Infect Control* 37: 658–664.
22. Falagas ME, Makris GC (2009) Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *J Hosp Infect* 71: 301–306.
23. Gause GF (1932) Experimental studies on the struggle for existence. *J Exp Biol* 9: 389–402.
24. Hardin G (1960) The competitive exclusion principle. *Science* 131: 1292–1297.
25. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 8: 15–25.
26. Gatesoupe FJ (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147–165.
27. Temmerman R, Vervaeren H, Noseda B, Boon N, Verstraete W (2007) Inhibition of *Legionella pneumophila* by *Bacillus sp.* *Eng Life Science* 7: 1–8.
28. Rodrigues L, van der Mei H, Teixeira JA, Oliveira R (2004) Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 306–311.
29. Rodrigues L, van der Mei HC, Teixeira J, Oliveira R (2004) Influence of biosurfactants on probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Appl Environ Microbiol* 70: 4408–4410.
30. Rodrigues L, van der Mei H, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R (2006) Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 107–112.
31. Rodrigues LR, Banat IM, van der Mei HC, Teixeira JA, Oliveira R (2006) Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *J Appl Microbiol* 100: 470–480.
32. Walencka E, Rozalska S, Sadowska B, Rozalska B (2008) The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol (Praha)* 53: 61–66.
33. Bauer AW, Perry DM, Kirby WM (1959) Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci; an analysis of technique and results. *A M A Arch Intern Med* 104: 208–216.
34. Kirby WM, Yoshihara GM, Sundsted KS, Warren JH (1957) Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiot Annu* 1956–1957:892–897.
35. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493–496.
36. CLSI M45A (2006) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).
37. CLSI M2-A9 (2009) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. 9th ed. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
38. CLSI M100-S20 (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
39. Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ (2013) Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* 13: 632–642.
40. Donskey C (2013) Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections? *Am J Infect Control* 41: S12–S19.
41. Shu M, Wang Y, Yu J, Kuo S, Coda A, et al. (2013) Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 8: e55380.
42. Levkovich T, Poutahidis T, Smillie C, Varian BJ, Ibrahim YM, et al. (2013) Probiotic bacteria induce a 'glow of health'. *PLoS One* 8: e53867.
43. Ohlsson C, Engdahl C, Fak F, Andersson A, Windahl SH, et al. (2014) Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS One* 9: e92368.
44. Woo J, Ahn J (2013) Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 56: 307–313.
45. Christiaen SE, Matthijs N, Zhang XH, Nelis HJ, Bossier P, et al. (2014) Bacteria that inhibit quorum sensing decrease biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Pathog Dis* 70: 271–279.
46. Beric T, Stankovic S, Draganic V, Kojic M, Lozo J, et al. (2013) Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample. *J Appl Microbiol*.
47. Ustok FI, Packman LC, Lowe CR, Christie G (2014) Spore germination mediated by *Bacillus megaterium* QM B1551 SleL and YpeB. *J Bacteriol* 196: 1045–1054.
48. de Boer AS, Diderichsen B (1991) On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 1–4.
49. Leonel Ochoa-Solano J, Olmos-Soto J (2006) The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol* 23: 519–525.
50. Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, et al. (2007) *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 957–967.
51. Porwal S, Lal S, Cheema S, Kalia VC (2009) Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS One* 4: e4438.

52. Ran C, Carrias A, Williams MA, Capps N, Dan BC, et al. (2012) Identification of *Bacillus* strains for biological control of catfish pathogens. *PLoS One* 7: e45793.
53. Al-Ajlani MM, Sheikh MA, Ahmad Z, Hasnain S (2007) Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmedia commercial medium. *Microb Cell Fact* 6: 17.
54. Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, et al. (2014) Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 9: e92486.
55. Adam M, Heuer H, Hallmann J (2014) Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PLoS One* 9: e90402.
56. Barnes AG, Cerovic V, Hobson PS, Klavinskis LS (2007) *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *Eur J Immunol* 37: 1538–1547.
57. de Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RC, Amorim JH, et al. (2014) *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One* 9: e87454.
58. Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, et al. (2010) Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine* 28: 1021–1030.
59. Lee S, Belitsky BR, Brown DW, Brinker JP, Kerstein KO, et al. (2010) Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 28: 6658–6665.
60. Amuguni JH, Lee S, Kerstein KO, Brown DW, Belitsky BR, et al. (2011) Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. *Vaccine* 29: 4778–4784.
61. Permpoonpattana P, Hong HA, Phetcharaburanin J, Huang JM, Cook J, et al. (2011) Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. *Infect Immun* 79: 2295–2302.
62. Amuguni H, Lee S, Kerstein K, Brown D, Belitsky B, et al. (2012) Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. *Microbes Infect* 14: 447–456.
63. Hinc K, Stasilojc M, Piatek I, Peszynska-Sularz G, Isticato R, et al. (2014) Mucosal Adjuvant Activity of IL-2 Presenting Spores of *Bacillus subtilis* in a Murine Model of *Helicobacter pylori* Vaccination. *PLoS One* 9: e95187.
64. Chen YC, Sheng WH, Wang JT, Chang SC, Lin HC, et al. (2011) Effectiveness and limitations of hand hygiene promotion on decreasing healthcare-associated infections. *PLoS One* 6: e27163.
65. Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, et al. (2000) Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme. *Lancet* 356: 1307–1312.
66. Larsen N, Stuer-Lauridsen B, Cantor MD, Nielsen B, Brockmann E, et al. (2014) Characterization of *Bacillus spp.* strains for use as a probiotic additives in pig feed. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 1105–1118.