



Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: potential as sanitizing agents

Hastane patojenlerinin sert yüzeylerden bakteriyofajlar ve probiotiklerin birlikte kullanımıyla verimli bir şekilde uzaklaştırılması: sterilize edici ajanlar olarak potansiyel

Authors D'Accolti M, Soffritti I, Piffanelli M, [Bisi M](#), [Mazzacane S](#), [Caselli E](#)

Received 3 April 2018

Accepted for publication 16 May 2018

Published 30 July 2018 Volume 2018:11 Pages 1015–1026

DOI <https://doi.org/10.2147/IDR.S170071>

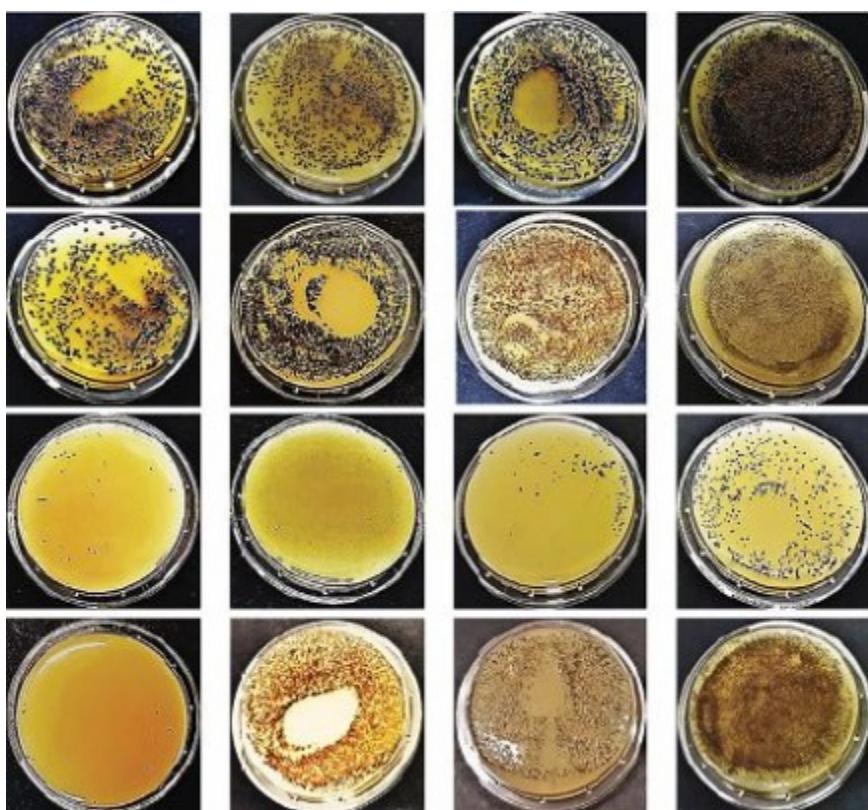
Checked for plagiarism Yes

Review by Single-blind

Peer reviewers approved by Dr Amy Norman

Peer reviewer comments 2

Editor who approved publication: Dr Joachim Wink



Maria D'Accolti,¹ Irene Soffritti,¹ Micol Piffanelli,¹ Matteo Bisi,¹ Sante Mazzacane,¹ Elisabetta Caselli^{1,2}

¹CIAS Interdepartmental Centre, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy; ²Section of Microbiology, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy

Purpose: Many hospital-acquired infections (HAIs) can be transmitted by pathogens contaminating hospital surfaces, not efficiently controlled by conventional sanitation, which can indeed contribute to the selection of MDR strains. Bacteriophages have been suggested as decontaminating agents, based on their selective

ability to kill specific bacteria. However, there are no data on their stability in detergents and their potential use in routine sanitation. On the other hand, a probiotic-based sanitation system (Probiotic Cleaning Hygiene System, PCHS) was recently shown to stably reduce pathogens on treated surfaces. However, its action is not specific and slow, being based on competitive antagonism. This work aimed to assess the effectiveness of a combined use of phages and PCHS in removing HAI-associated pathogens from different hard surfaces.

Amaç: Hastane kaynaklı bir çok enfeksiyon (HAI), MDR suşlarının seçimine katkıda bulunabilecek geleneksel sanitasyon ile etkili bir şekilde kontrol edilmeyen, hastane yüzeylerini kirleten patojenler tarafından bulaşabilir. Bakteriyofajlar, spesifik bakterileri öldürme konusundaki seçici yeteneklerine bağlı olarak dekontamine edici ajanlar olarak önerilmiştir. Bununla birlikte, deterjanlardaki kararlılıklarını ve rutin sanitasyondaki potansiyel kullanımları hakkında herhangi bir veri yoktur. Öte yandan, probiyotik bazlı bir sanitasyon sisteminin (Probiotic Cleaning Hygiene System, PCHS) tedavi edilen yüzeylerdeki patojenleri stabil bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, eylemi rekabetçi ve rakip düşmanlığa dayanan, spesifik ve yavaş değildir. Bu çalışma, HAI ile ilişkili patojenlerin farklı sert yüzeylerden uzaklaştırılmasında fajların ve PCHS'lerin kombin kullanımlarının etkinliğini değerlendirmeyi amaçlamıştır.

Materials and methods: The decontamination ability of phages in PCHS was tested in vitro and in situ, against drug-susceptible or resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* strains, and using bacterial densities similar to those detected on hospital surfaces.

Malzemeler ve yöntemler: PCHS'deki fajların dekontaminasyon kabiliyeti, ilaca duyarlı veya dirençli *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı ve hastane yüzeylerinde tespit edilenlere benzer bakteri yoğunlukları kullanılarak in vitro ve yerinde test edildi.

Results: Phages targeted efficiently all tested bacteria, maintaining their full activity when added to the PCHS detergent. Notably, the combined use of phages and PCHS not only resulted in a rapid reduction (up to >90%) of the targeted pathogens, but also, due to the stabilizing effect of probiotics, the pathogens were maintained at low levels (>99%) at later times too, when instead the effect of phages tends to diminish.

Sonuçlar: Fajlar, PCHS deterjanına eklendiklerinde tam etkinliklerini koruyarak test edilen tüm bakterileri verimli bir şekilde hedefledi. Özellikle, fajların ve PCHS'lerin birleşik kullanımı, sadece hedeflenen patojenlerin hızlı bir şekilde azalmasına (>> 90) neden olmakla kalmadı, aynı zamanda probiyotiklerin stabilize edici etkisinden dolayı, patojenler düşük seviyelerde tutuldu (>% 99) daha sonraki zamanlarda, bunun yerine, fajların etkisi azalmaya meyillidir.

Conclusion: These results suggest that a combined biological system might be successfully used in hospital sanitation protocols, potentially leading to effective and safe elimination of MDR pathogens from the hospital environment.

Sonuç: Bu sonuçlar, kombin bir biyolojik sistemin, hastane sağlık protokollerinde, MDR patojenlerinin hastane ortamından etkin ve güvenli bir şekilde elimine edilmesine yol açan başarılı bir şekilde kullanılabilceğini göstermektedir.

Keywords: drug-resistant bacteria, hospital infections, biological decontamination, bacteriophages, probiotics

Anahtar Sözcükler: ilaca dirençli bakteriler, hastane enfeksiyonları, biyolojik dekontaminasyon, bakteriyofajlar, probiyotikler

[Corrigendum](#) for this paper has been published Bu makale için Corrigendum yayınlandı

Plain language summary

The so-called hospital-acquired infections are often transmitted by microbes contaminating hospital surfaces, which are also often resistant to drugs, consequently causing infections very hard to treat, responsible for millions of deaths in the western world. Unfortunately, conventional chemicals-based cleaning is not effective in eliminating in a stable way such pathogenic microbes, indeed promoting their resistance to disinfectants and drugs. In an attempt to find a method capable of fighting such pathogens, we recently studied a biological approach based on the use of beneficial bacteria, showing that they can abate

pathogens without inducing drug resistance. However, probiotic action is neither rapid nor specific. By contrast, bacteriophages are able to kill specific bacteria very rapidly, but their action is limited in time.

Consequently, based on the properties of probiotics and bacteriophages, we wanted to test their combined use as a potential system for stably eliminating bacteria mainly responsible for hospital infections, with particular attention to drug-resistant ones. Our results, obtained using an eco-friendly cleanser added with bacteriophages and probiotics, showed that this biological approach is effective in stably eliminating surface pathogens, as it combines the rapid and specific action of bacteriophages with the stabilizing and general action of probiotics. This approach opens new perspectives in the management of infection control in the hospital environment.

Düz dil özeti

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar, sıklıkla, ilaçlara da dirençli olan hastane yüzeylerini kirleten mikroplar tarafından bulaşır, dolayısıyla batı dünyasında milyonlarca ölümden sorumlu olan, tedavi edilmesi zor olan enfeksiyonlara neden olur. Ne yazık ki, konvansiyonel kimyasallara dayalı temizleme, bu tür patojen mikropların kararlı bir şekilde elimine edilmesinde etkili değildir;

Sonuç olarak, probiotiklerin ve bakteriyofajların özelliklerine dayanarak, bunların kombine kullanımını, özellikle ilaç enfeksiyonuna dirençli olanlara özellikle hastane enfeksiyonlarından sorumlu olan bakterileri stabil bir şekilde ortadan kaldırılmak için potansiyel bir sistem olarak test etmek istedik. Bakteriyofajlar ve probiotiklerle eklenen çevre dostu bir temizleyici kullanılarak elde edilen sonuçlarımız, biyolojik yaklaşımın, bakteriyofajların hızlı ve spesifik etkisini probiotiklerin dengeleyici ve genel etkisiyle birleştirdiği için, yüzey patojenlerinin stabil bir şekilde giderilmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu yaklaşım hastane ortamında enfeksiyon kontrolünün yönetiminde yeni bakış açıları açar.

Introduction

Healthcare-associated or hospital-acquired infections (HAIs) represent one of the major concerns in the western world, impairing the clinical outcome of up to 15% of all hospitalized patients.¹ Every year in the European community about 3.2 million patients acquire an HAI, and 37,000 die as a direct consequence of HAI, also because of the growing presence of multidrug-resistant (MDR) pathogens.^{1,2}

Based on several evidences, the health care environment can significantly contribute to HAI transmission,³

⁴ as hospital surfaces represent the reservoir of pathogens spread by hospital inpatients and personnel.⁵ Persistently contaminated surfaces and objects, in fact, continually come into contact with hospitalized subjects, threatening patients' health just because of hospitalization.^{1,2} Several studies have shown that hospital surfaces are indeed persistently contaminated by several, often drug-resistant, pathogens,^{3,5,7-9} most frequently including *Staphylococcus* spp. (including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), and *Pseudomonas* spp.^{3,10-12} *S. aureus* is a leading cause of hospital-acquired infections in developed countries.¹³ It is transmissible between patients, via hospital staff, and by the contaminated environment. Currently, *S. aureus* is the species most commonly associated to blood stream, lung, soft tissue, and skin infections.¹⁴ In addition, *S. aureus* has evolved resistance to multiple antibiotics in the recent decades, and the MRSA group is also resistant to erythromycin, levofloxacin, tetracycline, clindamycin, gentamicin, trimethoprim, and doxycycline, while being usually susceptible to vancomycin.¹⁵ However, vancomycin-resistant MRSA might become predominant in the future, leaving clinicians without any treatment option.

Among *Enterobacteriaceae*, *E. coli* represents a major cause of several HAIs, especially because of the rising

antibiotic resistance in particularly virulent *E. coli* types, such as Shiga toxin producing *E. coli* and enteropathogenic *E. coli* strains.¹⁶

Similarly, another Gram-negative bacterium, the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, represents a leading cause of nosocomial infections, mainly in subjects with compromised immune defence. Due to its mechanisms for adaptation, survival, and resistance to a wide range of antibiotics, infections sustained by *P. aeruginosa* represent an increasing public health threat.

A characteristic shared by all mentioned HAI-associated bacteria is the high prevalence of multidrug resistance. The proportion of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β-lactamases (which confer resistance to many β-lactam antibiotics) and carbapenemases is increasing around the world, and infections sustained by these organisms are often associated with high mortality.^{17,18} Not surprisingly, all the three mentioned groups have been included in the global priority list of antibiotic-resistant bacteria by the World Health Organization (WHO), with Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa* in the “critical” priority group and *S. aureus* in the “high” priority group.¹⁹

Despite the efforts to prevent infections by such pathogens, their transmission still occurs, suggesting that more effective strategies are needed to eliminate the risk of contracting pathogens from hospital environments.

So far, removal of pathogens from hospital surfaces has been addressed by conventional chemicals-based sanitation, which, however, show important limitations, as it has a temporary effect, a high environmental impact, it is not targeted toward specific pathogens, and most importantly can contribute to the selection of both disinfectant-resistant and antibiotic-resistant pathogens.^{20,21} This last aspect, in particular, represents a highly undesirable side effect of chemical cleaning, as MDR pathogens have been constantly and rapidly growing in the recent decades and a high proportion of HAIs is currently sustained by them.^{22,23} Actually, the rising antibiotic resistance of bacterial pathogens appears as one of the most important challenges facing modern medicine, and antibiotic resistance has become so widespread that WHO reports that it is now “one of the biggest threats to global health, food security, and development.”²⁴

In addition, it has been shown that the risk to acquire an infection sustained by a specific pathogen increases for patients occupying the rooms where an infected/colonized patient with such pathogen was previously present in the same hospital room.²⁵⁻²⁷ Thus, it would be important to develop sanitation procedures that are able to fight specific MDR pathogens and outbreaks associated to the spread of specific pathogens, as conventional disinfectants are not capable of doing so.

Based on these observations, an ideal sanitation approach should be eco-sustainable, able to remove specific HAI-associated pathogens, including those that are antibiotic-resistant, and devoid of undesirable side effect such as drug resistance selection and/or induction.

In the search for effective methods, we recently studied a probiotic-based sanitation system consisting of an eco-friendly cleaning solution added with spores of probiotic bacteria belonging to the *Bacillus* genus (Probiotic Cleaning Hygiene System, PCHS), showing that it is efficient in stably abating pathogens on hospital surfaces, including drug-resistant strains,²⁸⁻³⁰ being also safe for hospital inpatients.³¹ However, being based on competitive antagonism,²⁸ PCHS action is not addressed toward specific microbial targets, and is

quite slow, as several weeks are needed to achieve maximum inhibition of pathogens growth on treated surfaces.

By contrast, bacteriophages are characterized as having a very rapid action against specific bacteria, and have consequently been suggested and tested as potential decontaminating agents. Phage application has been proved effective against foodborne bacteria, for treatment of food or food processing surfaces,³²⁻³⁴ as well as against various bacterial targets, including drug-resistant *S. aureus* and *E. coli* strains.^{16,32,35,36} Based on these data, US Food and Drug Administration (FDA) approved the use of specific phages as antimicrobial agents against food contamination by *Listeria monocytogenes*.³⁷

However, results reported so far showed the need for prolonged contact between phages and target bacteria in aqueous solution,³² which is scarcely compatible with routine sanitation protocols and inpatients presence. Also, phage activity was tested using high bacterial densities, around 10⁸ colony forming units (CFU) per square meter,³⁶ that favor the encounter between phages and target bacteria, facilitating phage infection of bacterial targets, but are not relevant to health care settings surfaces, where the average level of contamination is consistently lower (between 10³ and 10⁵ CFU/m²) and dispersed on huge surfaces. This implies that, to be predictive for routine surface sanitation, in vitro tests might be performed using bacterial amounts comparable to those found on hospital surfaces, and limiting as far as possible the time of contact in aqueous solution between phages and target bacteria. In addition, phages are not particularly resistant in a dry environment; thus, the decontamination obtained by phages is unlikely to result in a stable abatement of the targeted pathogens, instead needing repeated treatments to guarantee a low level of the targeted pathogens.

Based on phages and PCHS characteristics, we wanted to assess their potential to be used as a combined product, testing their activity on hard surfaces, against the most common HAI-associated, even drug-resistant, nosocomial pathogens, namely *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*.

The results showed that the combined use of phages and PCHS resulted in a strong and stable abatement of the targeted species, suggesting that biological sanitization might be applied in routine cleaning protocols, being potentially able to control a high number of HAI-associated pathogens.

Giriş Sağlık bakımıyla ilişkili veya hastaneden edinilmiş enfeksiyonlar (HAI'ler) batı dünyasındaki en büyük sorunlardan birini temsil etmekte ve tüm hastanede yatan hastaların% 15'ine kadar olan klinik sonuçları olumsuz etkilemektedir.1 Avrupa toplumunda her yıl yaklaşık 3,2 milyon hasta HAI almaktadır. ve 37.000, aynı zamanda, çoklu ilaca dirençli (MDR) patojenlerin artan varlığından dolayı, HAI'nin doğrudan bir sonucu olarak ölmektedir.1,2 Çeşitli kanıtlara dayanarak, sağlık ortamı, hastane yüzeyleri, hastane hastaları ve personeli tarafından yayılan patojenlerin rezervini temsil ettiğinden, 3-8 arası HAI bulaşmasına önemli ölçüde katkıda bulunabilir.6 Aslında sürekli hastaneye yatırılan kişilerle sürekli temas halindedirler. Hastane yarışı nedeniyle hasta sağlığını tehdit eden denekler.1,2 Bazı çalışmalar, hastane yüzeylerinin gerçekten de *Staphylococcus* spp. dahil en sık 3,5,7–9, sıklıkla ilaca dirençli patojenler tarafından kontamine olduğunu göstermiştir. (metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, MRSA), Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) ve *Pseudomonas* spp.^{3,10–12} dahil *S. aureus*, gelişmiş ülkelerde hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen bir nedenidir.¹³ Hastalar arasında, hastane personeli ve kirli ortamlar arasında bulaşıcıdır. Günümüzde, *S. aureus* en sık kan akımı, akciğer, yumuşak doku ve cilt enfeksiyonları ile ilişkili

türlerdir.¹⁴ Ek olarak, *S. aureus* son yıllarda çoklu antibiyotiklere direnç geliştirmiştir ve MRSA grubu da Vankomisine genellikle duyarlı iken eritromisin, levofloksasin, tetrasiklin, klindamisin, gentamisin, trimetoprim ve doksisiklin, vankomisine genellikle duyarlı iken, ancak vankomisine dirençli MRSA, gelecekte herhangi bir tedavi seçeneği olmayan klinisyenler bırakarak baskın hale gelebilir.

Enterobacteriaceae'ler arasında *E. coli*, özellikle HA virüsü, özellikle de virülen *E. coli* türlerinde, Shiga toksini üreten *E. coli* ve enteropatojenik *E. coli* suşları gibi antibiyotik direncinin artması nedeniyle ana nedenleri temsil eder.¹⁶ Benzer şekilde, bir başka Gram negatif bakteri olan fırsatçı patojen *Pseudomonas aeruginosa*, başta immün savunması olan kişilerde hastane enfeksiyonlarının onde gelen nedenini temsil eder. Adaptasyon, hayatı kalma ve çok çeşitli antibiyotiklere direnç mekanizmaları nedeniyle, *P. aeruginosa* tarafından sürdürülen enfeksiyonlar artan bir halk sağlığı tehdidini temsil etmektedir.

Bahsedilen HAI ile ilişkili tüm bakteriler tarafından paylaşılan bir özellik, çoklu ilaç direncinin yüksek prevalansıdır. Geniş spektrumlu β-laktamaz üreten (peki çok β-laktam antibiyotiğe direnç sağlayan) ve karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae oranı dünya genelinde artmaktadır ve bu organizmalar tarafından sürdürülen enfeksiyonlar genellikle yüksek mortalite ile ilişkilidir.^{17,18} Şaşırıcı değil, hepsi söz konusu üç grup, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından antibiyotiğe dirençli bakterilerin global öncelik listesine, "kritik" öncelik grubunda Enterobacteriaceae ve *P. aeruginosa* ve "yüksek" öncelik grubunda *S. aureus* ile dahil edildi.¹⁹ Bu gibi patojenlerin neden olduğu enfeksiyonları önleme çabalarına rağmen, bu hastalıkların bulaşmasına neden olmak için patojenlerin büzülme riskini ortadan kaldırılmak için daha etkili stratejilere ihtiyaç duyulduğunu öne sürerek iletimleri devam etmektedir.

Şimdiye kadar çevre sorunları için çok önemli bir kaynak oldu. Bu son özellik kimyasal temizliğin oldukça istenmeyen bir yan etkisidir. Halen yüksek oranda bir HAI oranı, onlar tarafından sürdürülmektedir. ,²⁴ Başka bir deyişle, öyle olacak. Buna ilaveten MDR patojenleriyle baş etmenin önemli bir yoludur.

Bu gözlemlere dayanarak, güvenli ve etkili olacak şekilde ideal bir yaklaşım tasarlamanmalıdır.

Etkili yöntemlerin araştırılmasında, yakın zamanda, *Bacillus* cinsine (Probiotic Cleaning Hygiene System, PCHS) ait olan probiyotik bakteri sporlarına eklenmiş, çevre dostu bir temizleme çözeltisinden oluşan probiyotik bazlı bir temizlik sistemi araştırdık. ilaca dirençli suşlar da dahil olmak üzere hastane yüzeylerinde stabil olarak azaltan patojenler, 28-30 da hastane hastaları için güvenlidir.³¹ Bununla birlikte, rekabetçi düşmanlığa dayanarak, 28 PCHS hareketi spesifik mikrobiyal hedeflere yönelik değildir ve çok yavaş olduğu gibi tedavi edilen yüzeylerde azami patojen üremesi inhibisyonu elde etmek için haftalar gereklidir.

Buna karşılık, bakteriyofajlar, belirli bakterilere karşı çok hızlı bir etkiye sahip olması ile karakterize edilir ve sonuç olarak potansiyel dekontamine edici ajanlar olarak önerilmiş ve test edilmiştir. Faj uygulamasının, gıda kaynaklı bakterilere karşı, gıda veya yiyecek işleme yüzeylerinin tedavisi için, 32-34'ün yanı sıra ilaca dirençli *S. aureus* ve *E. coli* suşları dahil olmak üzere çeşitli bakteri hedeflerine karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır.^{16,32,35,36} Bu verilere dayanarak, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), *Listeria monocytogenes* tarafından gıda bulaşmasına karşı antimikrobiyal ajan olarak spesifik fajların kullanımını onaylamıştır. Bununla birlikte, bugüne kadar rapor edilen sonuçlar, sulu çözeltideki fajlar ve hedef bakteriler arasında uzun süreli teması ihtiyaç duyulduğunu gösterdi; bu, 32 rutin sanitasyon protokollerini ve yatan hastaların varlığı ile neredeyse hiç uyumlu değildi.

Ayrıca, faj aktivitesi, bakteriyel hedeflerin faj enfeksiyonunu kolaylaştmak, ancak sağlık bakım ortamları yüzeyleriyle ilgili olmayan, fajlar ve hedef bakteriler arasında karşılaşmayı destekleyen, metre kare başına 108 koloni oluşturan birim (CFU), 36, yüksek bakteri yoğunlukları kullanılarak test edildi. ortalama kirleme seviyesinin sürekli olarak daha düşük olduğu (103 ila 105 CFU / m² arasında) ve çok büyük yüzeylerde dağıldığı yerlerde. Bu, rutin yüzey sanitasyonu için prediktif olması için, hastane yüzeylerinde bulunanlarla karşılaştırılabilir bakteri miktarları kullanılarak in vitro testlerin yapılabileceği ve fajlar ile hedef bakteriler arasındaki sulu çözeltide temas süresinin mümkün olduğunda sınırlanabilecegi anlamına gelir. Ek olarak, fajlar kuru ortamda özellikle dirençli değildir; Bu nedenle, fajlar tarafından elde edilen dekontaminasyonun, hedeflenen patojenlerin kararlı bir şekilde azaltılmasına neden olması muhtemel değildir, bunun yerine hedeflenen patojenlerin düşük bir seviyesini garanti etmek için tekrarlanan tedavilere ihtiyaç duyulur.

Fajlar ve PCHS özelliklerine dayanarak, kombin bir ürün olarak kullanılma potansiyellerini, sert yüzeylerde etkinliklerini test ederek, en yaygın HAI ile ilişkili, hatta ilaca dirençli, nozokomiyal patojenlere, yani *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*.

Sonuçlar, fajların ve PCHS'lerin birleşik kullanımının, hedeflenen türlerin güçlü ve kararlı bir şekilde azaltılmasını sağladığını gösterdi; bu, biyolojik olarak sterilizasyonun rutin temizleme protokollerinde uygulanabileceğini ve potansiyel olarak yüksek sayıda HAI ile ilişkili patojeni kontrol edebildiğini gösterdi.

Materials and methods

Bacterial species

The bacterial strains used in in vitro experiments included strains obtained from American Type Culture Collection (ATCC), and wild-type strains isolated from hospital surfaces. ATCC strains included *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), and *P. aeruginosa* (ATCC BAA-47). Hospital isolates included three strains selected for their drug resistance characteristics: *S. aureus* (SA2-R73), *E. coli*(EC-R60), and *P. aeruginosa* (PA-V6). Hospital isolates were collected by direct sampling of hospital surfaces with 55 mm diameter contact Rodac plates (24 cm² surface), containing the following selective media: Baird–Parker agar (for *Staphylococcus* spp., cat. n. 146189), MacConkey agar (for *Enterobacteriaceae* spp., cat. n. 146427), and cetrimide agar (for *Pseudomonas* spp., cat. n. 146768) (all bacterial media were from Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Grown colonies with morphological *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* features were further streaked on the corresponding selective medium and incubated at 37°C for 24 hours, to isolate single pure colonies. Each individual colony was then characterized by Gram-staining, and identified by appropriate biochemical tests (API-Staph, cat. n. 20500, and API-20E, cat. n. 20100; Biomerieux, Florence, Italy).

Malzemeler ve yöntemler

Bakteriyel türler

İn vitro deneylerde kullanılan bakteri suşları, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) elde edilen suşları ve hastane yüzeylerinden izole edilmiş vahşi suşları içerir. ATCC suşları arasında *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) ve *P. aeruginosa* (ATCC BAA-47) bulunur. Hastane izolatları, ilaç direnç özellikleri için seçilen üç suş içermiştir: *S. aureus* (SA2-R73), *E. coli* (EC-R60) ve *P. aeruginosa* (PA-V6). Hastane izolatları, hastane yüzeylerinin doğrudan aşağıdaki örnekleme ortamını içeren 55 mm çaplı temas Rodac plakaları (24 cm² yüzey) ile örneklenmesi yoluyla toplandı: Baird-Parker agar (*Staphylococcus* spp., Kat. 146189 için), MacConkey agar (for *Enterobacteriaceae* spp., Kat., 146427) ve setirimid agar (*Pseudomonas* spp., Kat., 146768 için) (bütün bakteriyel ortamlar Merck Millipore, Billerica, MA, ABD'den) idi. Morfolojik *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* özelliklerine sahip büyütülmüş koloniler, karşılık gelen seçici besiyerine serpildi ve tek saf kolonileri izole etmek için 24 saat 37 ° C'de inkübe edildi. Her bir koloni daha sonra Gram boyama ile karakterize edildi ve uygun biyokimyasal testlerle tanımlandı (API-Staph, kat. N. 20500 ve API-20E, kat. N. 20100; Biomerieux, Florence, Italy).

After identification, all isolates were expanded overnight in tryptic soy broth (TSB, cat. n. 146599; Merck Millipore) at 37°C, frozen in 50% sterile glycerol, and kept at –80°C until use. Each isolate was characterized for antibiotic resistance by conventional disc-diffusion Kirby–Bauer antibiograms, using Mueller–Hinton agar plates (cat. n. 105437; Merck Millipore), testing the following antibiotics: penicillin G (cat. n. CT0043B; Oxoid, Altringham, UK), ampicillin (Oxoid; cat. n. CT0003B; Oxoid), vancomycin (cat. n. CT0058B; Oxoid), oxacillin (cat. n. CT0040B; Oxoid), ofloxacin (cat. n. CT0446B; Oxoid), cefotaxime (cat. n. CT066B; Oxoid), cefoxitin (cat. n. CT0119B; Oxoid), gentamicin (cat. n. 9026; Liofilchem, Italy), imipenem (cat. n. CT0455B; Oxoid), aztreonam (cat. n. 9008; Liofilchem, Liofilchem, Teramo, Italy), meropenem (cat. n. 9068; Liofilchem), and colistin (cat. n. CT0017B; Oxoid). Zone inhibition diameters were interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of minimum inhibitory concentration (MIC) and inhibition zone diameters³⁸ and to the Clinical and Laboratory Standards Institute manual (26th edition).³⁹ In addition, MICs of resistant strains were also measured, accordingly to European Food Safety Authority guidelines, by using antibiotic stripes containing serial dilutions of each antibiotic (cat. n. 92003, 92033, 92006, 92066, 92141, 92009, 92054, 92085, 92099, 92015, 92102, 92057; Liofilchem).

The concentrated PCHS detergent included, as previously described,²⁸ 10⁷/mL spores of three species of probiotics belonging to the *Bacillus* genus, namely *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, and *Bacillus megaterium*.

After identification, all isolates were expanded overnight in tryptic soy broth (TSB, cat. n. 146599; Merck Millipore) at 37°C, frozen in 50% sterile glycerol, and kept at -80°C until use. Each isolate was characterized for antibiotic resistance by conventional disc-diffusion Kirby-Bauer antibiograms, using Mueller-Hinton agar plates (cat. n. 105437; Merck Millipore), testing the following antibiotics: penicillin G (cat. n. CT0043B; Oxoid, Altringham, UK), ampicillin (Oxoid; cat. n. CT0003B; Oxoid), vancomycin (cat. n. CT0058B; Oxoid), oxacillin (cat. n. CT0040B; Oxoid), ofloxacin (cat. n. CT0446B; Oxoid), cefotaxime (cat. n. CT066B; Oxoid), cefoxitin (cat. n. CT0119B; Oxoid), gentamicin (cat. n. 9026; Liofilchem, Italy), imipenem (cat. n. CT0455B; Oxoid), aztreonam (cat. n. 9008; Liofilchem, Liofilchem, Teramo, Italy), meropenem (cat. n. 9068; Liofilchem), and colistin (cat. n. CT0017B; Oxoid). Zone inhibition diameters were interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of minimum inhibitory concentration (MIC) and inhibition zone diameters²⁸ and to the Clinical and Laboratory Standards Institute manual (26th edition).²⁹ In addition, MICs of resistant strains were also measured, accordingly to European Food Safety Authority guidelines, by using antibiotic stripes containing serial dilutions of each antibiotic (cat. n. 92003, 92033, 92006, 92066, 92141, 92009, 92054, 92085, 92099, 92015, 92102, 92057; Liofilchem).

The concentrated PCHS detergent included, as previously described,²⁸ 10⁷/mL spores of three species of probiotics belonging to the *Bacillus* genus, namely *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, and *Bacillus megaterium*.

Tanımlamadan sonra, tüm izolatlar gece boyunca triptik soya suyu (TSB, kat. No. 146599; Merck Millipore) içinde 37 ° C'de genişletildi, % 50 steril gliserolde donduruldu ve kullanılana kadar -80 ° C'de tutuldu. Her izolat, aşağıdaki antibiyotikleri test eden Mueller-Hinton agar plakalarını (kat. N. 105437; Merck Millipore) kullanarak, geleneksel disk difüzyon Kirby-Bauer antibiyogramları ile antibiyotik direnci için karakterize edildi: penisilin G (kat. CT0043B; Oxoid, Altringham, UK), ampisilin (Oxoid; kat. N. CT0003B; Oxoid), vankomisin (kat. N. CT0058B; Oxoid), oksasilin (kat. N. CT0040B; Oxoid), ofloxacin (kat. n. CT0446B; Oxoid), sefotaksim (kat. n. CT066B; Oxoid), sefoksitin (kat. n. CT0119B; Oxoid), gentamisin (kat. 9026; Liofilchem, İtalya), imipenem (kat. n. CT0455B; Oxoid), aztreonam (kat. 9008; Liofilchem, Liofilchem, Teramo, İtalya), meropenem (kat., 9068; Liofilchem) ve kolistin (kat., CT0017B; Oxoid). Zon inhibisyon çapları, minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) ve inhibisyon zon çapları³⁸'in yorumlanması için Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi sınır tablolarına ve (Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü el kitabı (26. baskı).
suşlar ayrıca Avrupa Gıda Güvenliği Ötoritesi kılavuzuna göre, her bir antibiyotığın seri seyreltilerini içeren antibiyotik şeritleri kullanarak ölçüldü (kat. 92003, 92033, 92006, 92066, 92141, 92009, 92054, 92085, 92099, 92015, 92102, 92057; Liofilchem).

Konsantre PCHS deterjan, daha önce tarif edildiği gibi, *Bacillus* cinsine, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus megaterium*'a ait üç probiyotik türünden 28 10⁷ / mL spor içerir.

Bacteriophages

All bacteriophages used in this study were obtained from Eliava Institute (Staphylococcal phage and Pyophage; GA, USA). Phage preparations contained a mixture of selected lytic phages directed against *Staphylococcus* spp. (staphylococcal phage and Pyophage), as well as phages against *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *E. coli* and *P. aeruginosa* (Pyophage), at a concentration corresponding to 10⁵–10⁶ total plaque forming units (PFU)/mL. Phage mixtures were stored at 4°C until use, as indicated by manufacturer instructions. Each individual phage component was titrated by PFU counting on

the correspondent ATCC bacterial target. Briefly, phage stocks were serially diluted in TSB; then, 100 µL of diluted phages were mixed with 100 µL of bacterial suspension in logarithmic growth phase ($OD_{600nm} = 0.4$; spectrophotometer DU-640B; Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The bacteria and phages mixture was then added to 3 mL of soft agar, finally poured onto tryptic soy agar (TSA, cat. n. 146431; Merck Millipore) plates, and allowed to solidify for 15 minutes. Samples were performed in triplicate. After 24 hours incubation at 37°C, PFU were counted at the appropriate dilution.

Individual phage preparations specifically targeting each single bacterial species were obtained from the mixtures by the lysis plaque elution method. Briefly, phage plaques obtained on the plates were collected, disrupted by pulse-vortexing in 1 mL of TSB, and added to 5 mL of the appropriate bacterial culture at $OD_{600nm} = 0.4$. The suspension was incubated at 37°C under mild agitation until the solution was clear. The solution was then filtered through a 0.22 µm pore size membrane filter, added with 15% sterile glycerol, and stored at -80°C until use.

Each individual phage stock was titrated as already described; the final titer of each individual phage preparation was 10^{10} PFU/mL.

Bakteriyofaj

Bu çalışmada kullanılan tüm bakteriyofajlar Eliava Enstitüsü'nden (Staphylococcal faj ve Pyophage; GA, ABD) elde edildi. Faj terkipleri, Staphylococcus spp.'ye yönelik seçilmiş litik fajların bir karışımını içermiştir. (stafilocokal faj ve Pyophage), ayrıca Streptococcus spp., Proteus spp., E. coli ve P. aeruginosa'ya (Pyophage) karşı fajlar, 105-106 toplam plak oluşturma birimlerine (PFU) / mL'ye karşılık gelen bir konsantrasyondadır. Faj karışımıları, üretecinin talimatlarında belirtildiği gibi kullanıma kadar 4 °C'de saklandı. Her bir faj bileşeni, karşılık gelen ATCC bakteri hedefinde sayılan PFU ile titre edildi. Kısaca, faj stokları TSB'de seri olarak seyreltildi; daha sonra, 100 uL seyreltilmiş fajlar, logaritmik büyümeye fazında ($OD_{600nm} = 0.4$; spektrofotometre DU-640B; Beckman Coulter, Brea, CA, ABD) 100 uL bakteri süspansiyonu ile karıştırıldı. Bakteriler ve fajlar karışımı daha sonra 3 mL yumuşak agara ilave edildi, nihayet triptik soya agarı (TSA, kat. No. 146431; Merck Millipore) plakalarına döküldü ve 15 dakika katıldı. Numuneler üç kopya halinde gerçekleştirildi. 24 saat 37 °C'de inkübasyonun ardından PFU uygun dilüsyonda sayıldı.

Her bir bakteri türünü spesifik olarak hedef alan bireysel faj preparatları, liziz plak elüsyon yöntemi ile karışımından elde edildi. Kısaca, plakalar üzerinde elde edilen faj plakaları toplandı, 1 mL TSB'de puls vortekslenerek parçalandı ve $OD_{600nm} = 0.4$ 'te uygun bakteriyel kültürün 5 mL'sine ilave edildi. Süspansiyon, çözelti berraklaşınca kadar hafif çalkalamaya altında 37 °C'de inkübe edildi. Çözelti daha sonra 0.22 um gözenek boyutundaki bir zar filtreden süzüldü, % 15 steril gliserol ile eklendi ve kullanımlana kadar -80 °C'de saklandı.

Her bir bireysel faj stoku daha önce tarif edildiği gibi titre edildi; Her bir faj preparasyonunun nihai titresi, 1010 PFU / mL idi.

Host range analysis

The host range of each single phage stock was determined by spot testing, performed against all the bacterial strains used in the study. Briefly, overnight bacterial cultures in TSB were subcultured by 1:10 dilution and grown at 37°C under agitation until the suspension reached $OD_{600nm} = 0.4$. Aliquots (100 µL) of bacterial subculture were added to 3 mL of soft agar, overlaid on TSA plates, and allowed to solidify at room temperature for 15 minutes. Phage stocks were serially diluted in phosphate buffered saline (PBS) (with 10-fold increments) and 10 µL aliquots of phage dilutions were added to bacterial lawns, checking their lytic activity after 24 hours of incubation at 37°C. Spot tests were performed in triplicate.

Konak aralığı analizi Her bir faj stokunun konakçı aralığı, çalışmada kullanılan tüm bakteri sürümlerine karşı gerçekleştirilen spot testlerle belirlendi. Kısaca, TSB'deki gece boyunca bakteri kültürleri 1:10 dilüsyon ile alt kültürlandı ve süspansiyon $OD_{600nm} = 0.4$ olana kadar çalkalamaya altında 37 °C'de büyütüldü. 3 mL yumuşak agara alikotlar (100 uL) bakteri alt kültürü eklendi, TSA plakaları üzerine kaplandı ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca katılmasmaya bırakıldı. Faj stokları,

seri olarak fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (10 kat artışlarla) ile seyreltildi ve bakteri alanlarına, 10 saat boyunca, 37 ° C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra litik aktivitelerini kontrol ederek 10 uL faj dilüsyonu ilave edildi. Spot testler üç kopya halinde yapıldı.

Decontamination tests

The ability of phages to lyse *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* on different kinds of hard nonporous surfaces was assessed by in vitro decontamination assays.⁴⁰ Briefly, target bacteria were grown in TSB until reaching the logarithmic growth phase (checked by spectrophotometric reading, OD_{600nm}=0.4), and then diluted to obtain a final concentration of 4×10^6 CFU/mL. To mimic the bacterial load detectable on hospital surfaces, 10 µL of suspension were spread on a 24 cm² surface, obtaining a final density of 100 CFU/24 cm² (ie, 4×10^4 CFU/m²), which represents the average value of microbial contamination found on different types of hospital surfaces as detected in previous studies.^{28,29} Tested surfaces included plastic, glass, and ceramic surfaces (respectively represented by irradiated sterile plastic plates, or glass plates, and ceramic tiles sterilized by autoclave).

Seeded bacteria were allowed to dry for 15 minutes at room temperature; then, 50 µL of the concentrated individual phage solution diluted in PBS at a multiplicity of infection (MOI) of 10, 100, and 1000 were spread on the surface and allowed to dry in a maximum drying time of 10 minutes. Mock treatment with phage buffer alone was used as a control. Denatured alcohol was used as a positive control. Each sample was performed in triplicate.

After 1, 3, 6, and 24 hours, surfaces were directly sampled by contact Rodac plates containing the appropriate selective medium, to collect residual viable bacteria. Each plate, containing samples taken at the different time points, was incubated for 24 hours at 37°C and bacterial load was evaluated by enumerating plate CFU.

The same assays were performed by diluting phage preparations in PCHS eco-sustainable detergent (PCHS; Copma, Ferrara, Italy), already used for routine hospital cleaning.²⁸ The detergent was diluted 1:100 (v/v) in bi-distilled sterile water to obtain the work dilution as indicated by the manufacturer, and then used to suspend and dilute phage stocks. Phage stability was measured after 1, 2, 3, and 7 days at room temperature, by PFU titration on the specific bacterial targets, after removing the bacterial component by centrifugation. Following titration, the decontamination potential of the PCHS added with phages was tested in vitro by the already described decontamination assays, performed using 100 CFU/24 cm² of target bacteria and phage at 1000 MOI. In parallel, decontamination assays were also performed in situ, using the ceramic sink of a bathroom specifically isolated and artificially contaminated with 10^5 CFU/m² of *S. aureus* (ATCC strain), and treated with PCHS containing phages at 10^8 PFU/m² (MOI 1000).

Dekontaminasyon testleri

Fajların *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa'yı* farklı sert gözenekli olmayan yüzeylerde lize etme kabiliyetleri, in vitro dekontaminasyon deneyleri ile değerlendirildi. 40 Kısaca, hedef bakteriler, TSB'de logaritmik büyümeye fazına ulaşana kadar büyütüldü (kontrol edildi) Spektrofotometrik okuma ile OD_{600nm} = 0.4) ve daha sonra 4×10^6 CFU / mL'lik bir son konsantrasyon elde etmek için seyreltildi. Hastane yüzeylerinde tespit edilebilen bakteri yükünü taklit etmek için, 10 UL süspansiyon 24 cm²'lik bir yüzeye yayıldı, ortalama 100 mikroU / 24 cm² (yani 4×10^4 CFU / m²) yoğunluğunu elde etti. önceki çalışmalarda tespit edildiği gibi farklı hastane yüzeylerinde kirlenme bulundu.^{28,29} Test edilen yüzeyler plastik, cam ve seramik yüzeyleri (sırasıyla ışınlanmış steril plastik plakalar veya cam plakalar ve otoklavla sterilize edilmiş seramik fayanslarla temsil edilir) içeriyyordu.

Tohumlu bakterilerin oda sıcaklığında 15 dakika kurumasına izin verilmiştir; daha sonra, PBS içinde 10, 100 ve 1000'lik bir çok çeşitli enfeksiyonda (MOI) seyreltilmiş konsantre bireysel faj çözeltisinin 50 uL'si, yüzeye yayılmış ve maksimum

10 dakikalık bir kuruma süresi içinde kurumaya bırakılmıştır. Kontrol olarak yalnızca faj tamponuyla sahte muamele kullanılmıştır. Denatüre alkol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her numune üç kopya halinde gerçekleştirildi. 1, 3, 6 ve 24 saat sonra, yüzeyler artık uygun bakterileri toplamak için uygun seçici besiyerini içeren temas Rodac plakaları ile doğrudan örneklendi. Farklı zaman noktalarında alınan numuneleri içeren her plaka, 37°C 'de 24 saat inkübe edildi ve bakteri yükü, plaka CFU numaralandırılarak değerlendirildi. Aynı tahliller, hali hazırda rutin hastane temizliği için kullanılan PCHS eko-sürdürülebilir deterjan (PCHS; Copma, Ferrara, İtalya) içinde faj preparatlarının seyreltilmesiyle gerçekleştirildi. 28 Deterjan, iki damitilmiş steril içinde 1: 100 (h / h) seyreltildi. Üretici tarafından belirtilen şekilde iş seyreltme elde etmek için su ve faj stoklarını askıya almak ve seyreltmek için kullanılır. Faj stabilitesi oda sıcaklığında 1, 2, 3 ve 7 gün sonra spesifik bakteriyel hedeflere PFU titrasyonu ile bakteriyel bileşeni santrifüjleme ile uzaklaştırıldıktan sonra ölçülmüştür. Titrasyonun ardından, fajlarla eklenen PCHS'nin dekontaminasyon potansiyeli, önceden tanımlanmış dekontaminasyon analizleri ile in vitro olarak test edildi, 1000 CFU'de 100 CFU / 24 cm² hedef bakteri ve faj kullanılarak gerçekleştirildi. Paralel olarak, dekontaminasyon deneyleri, ayrıca, özel olarak izole edilmiş ve yapay olarak 105 CFU / m² S. aureus (ATCC suçu) ile kontamine olmuş bir banyoya ait seramik lavabo kullanılarak ve 108 PFU / m² de (MOI) faj içeren PCHS ile muamele edilmiş, ayrıca yerinde yapıldı. 1.000).

Statistical analysis

Statistical significance was measured by the unpaired one-tailed Student's *t*-test (STAT View software; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Values of *p*<0.05 were considered statistically significant.

Istatistiksel analiz İstatistiksel önem, eşleştirilmemiş tek kuyruklu Student *t* testi ile ölçülmüştür (STAT View yazılımı; SAS Institute Inc., Cary, NC, ABD). *P* <0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Results

Phage susceptibility of tested bacteria

S. aureus, *E. coli*, and *P. aeruginosa* spp., which are also frequently associated to HAI onset, are among the most common pathogens detected as persistent contaminants on hospital surfaces. Based on this observation, we wanted to assess phages effectiveness against such pathogens, using both ATCC reference strains and wild-type MDR hospital isolates belonging to the same target bacterial species. MDR hospital strains were isolated from hospital surfaces and biochemically identified. Prior to use, all bacterial isolates were characterized for antibiotic susceptibility. Drug susceptibility of bacterial targets used in the

decontamination assays is summarized in [Table 1](#). For MDR hospital isolates, the MIC is also provided.

Sonuçlar

Test edilen bakterilerin faj duyarlılığı

HAI başlangıcı ile de sıkça ilişkili olan *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* spp. Hastane yüzeylerinde kalıcı kirletici maddeler olarak tespit edilen en yaygın patojenler arasındadır. Bu gözleme dayanarak, hem ATCC referans suşlarını hem de aynı hedef bakteri türüne ait vahşi tip MDR hastane izolatlarını kullanarak, bu patojenlere karşı fajların etkinliğini değerlendirmek istedik. MDR hastane suşları hastane yüzeylerinden izole edildi ve biyokimyasal olarak tanımlandı. Kullanımdan önce, tüm bakteri izolatları antibiyotik duyarlılığı için karakterize edildi. Dekontaminasyon deneylerinde kullanılan bakteri hedeflerinin ilaç duyarlılığı Tablo 1'de özetlenmiştir. MDR hastane izolatları için MIC de sağlanmaktadır.

Table 1 Bacterial strains used in decontamination assays

Note: MICs ($\mu\text{g/mL}$) of hospital isolates are also reported in parentheses.

Abbreviations: AMP, ampicillin 10 µg; ATM, aztreonam 30 µg; CTX, cefotaxime 30 µg; FOX, cefoxitin 30 µg; COL, colistin 10 µg; CN, gentamicin 10 µg; IPM, imipenem 10 µg; MEM, meropenem 10 µg; OFX, ofloxacin 5 µg; OX, oxacillin 1 µg; P, penicillin 10 IU; VA, vancomycin 30 µg; MIC, minimal inhibitory concentration; ATCC, American Type Culture Collection; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

All bacterial targets, including wild-type MDR isolates, were analyzed for phage susceptibility, by spot testing on soft agar.

Each individual phage stock was active in lysing ATCC strains and, with a slightly inferior efficiency, also MDR isolates ([Figure 1](#)). Based on these results, decontamination assays phages were tested at 10, 100, and 1000 MOI against ATCC strains, and at 1000 MOI against MDR isolates.

Tablo 1 Dekontaminasyon deneylerinde kullanılan bakteri susları

Not: Hastane izolatlarının MİK ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de parantez içinde rapor edilmiştir.

Kisaltmalar: AMP, ampisilin 10 ug; ATM, aztreonam 30 ug; CTX, sefotaksim 30 ug; FOX, sefoksitin 30 ug; COL, kolistin 10 ug; CN, gentamisin 10 ug; IPM, imipenem 10 ug; MEM, meropenem 10 ug; OFX, ofloxacin 5 ug; OX, oksasilin 1 ug; P, penisilin 10 IU; VA, vankomisin 30 ug; MİK, minimal inhibitör konsantrasyon; ATCC, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu; S, duvarlı; Ben orta; R, dayanıklı

Koleksiyond, S, duyarlı, B+, orta, R, dayanıklı. Yabani tip MDR izolatları dahil olmak üzere tüm bakteri hedefleri, yumuşak agar üzerinde nokta testi ile faj duyarlılığı açısından analiz edildi. Her bir faj stoğu, lizat ATCC suşlarında aktifti ve hafif bir verimsizlikle, ayrıca MDR izolatları da gösterdi (**Şekil 1**). Bu sonuçlara dayanarak, dekontaminasyon deneyleri fajlar, ATCC suşlarına karşı 10, 100 ve 1000 MOI'de ve MDR izolatlarına karşı 1000 MOI'de test edildi.

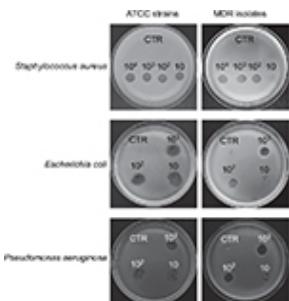


Figure 1 Phage activity against *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* (ATCC or MDR strains). Bacteriophage activity was verified by spot tests. Briefly, after suspension in soft agar, bacterial cultures were overlaid on TSA plates; serially diluted phage stocks were added to bacterial lawns, checking their lytic activity after 24 hours of incubation at 37°C. Results are representative of triplicate samples.



Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; MDR, multidrug-resistant; TSA, tryptic soy agar; CTR, control.

Şekil 1 *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı faj aktivitesi (ATCC veya MDR suşları). Bakteriyofaj aktivitesi spot testlerle doğrulandı. Kısaca, yumuşak agarın süspansiyonundan sonra bakteri kültürleri TSA plakaları üzerine kaplandı; seri olarak seyreltilmiş faj stokları, 37 ° C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından litik aktivitelerini kontrol ederek bakteriyel çimlere ilave edildi. Sonuçlar, üçlü numuneleri temsil etmektedir. Kısıtlamalar: ATCC, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu; MDR, çoklu ilaca dirençli; TSA, triptik soya agarı; TO, kontrol

Phage decontaminating potential on hard surfaces

Decontamination assays were carried out first on the ATCC bacterial strains. To mimic contamination conditions similar to those detected in clinical settings, we took as a reference the bacterial load detected on hospital surfaces in previous studies, performed in European hospitals.^{28,29} Bacterial cells were spread on surfaces at a density of 10² CFU/24 cm², corresponding to 4×10⁴ CFU/m². Tested hard nonporous surfaces included sterile plastic, glass, and ceramic. After spreading, bacteria were left to dry for 15 minutes; then, phage preparations, diluted in PBS, were applied uniformly in a 50 µL volume, sufficient to cover the 24 cm² contaminated area, followed by drying for not more than 10 minutes at room temperature. Mock treatments were performed by using PBS alone, whereas positive control treatments were performed by using a chemical disinfectant (denatured ethanol).

After 1, 3, 6, and 24 hours of incubation at room temperature, surfaces were sampled by applying contact Rodac plates, containing the appropriate selective medium. Residual bacterial CFU on artificially contaminated surfaces were then measured by enumerating grown colonies after 24 hours incubation at 37°C.

The results evidenced that phages can efficiently reduce viable bacterial cells on contaminated surfaces, even when the bacterial density is relatively low, with a reduction of up to 90±8% compared to mock-treated surfaces, independently of the surface type (ceramic, plastic, glass) and bacterial species (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) (Figure 2). A significant reduction, compared to controls, was detected at 1 hour post treatment at 10 MOI ($-40\pm15\%$, $p<0.05$). Phage efficiency increased with increasing MOI, with statistically significant differences between 10 and higher MOIs (100–1000) at all times tested ($p<0.01$), whereas no significant difference was observed between 100 and 1000 MOI.

Sert yüzeylerde faj dekontaminasyon potansiyeli

Dekontaminasyon deneyleri önce ATCC bakteri suşları üzerinde gerçekleştirildi. Klinik ortamlarda tespit edilenlere benzer kontaminasyon koşullarını taklit etmek için, önceki çalışmalarda hastane yüzeylerinde tespit edilen, Avrupa hastanelerinde gerçekleştirilen bakteri yükünü referans alındı.^{28,29} Bakteriyel hücreler 102 CFU / 24 yoğunlukta yüzeylere yayıldı cm², 4 × 104 CFU / m²'ye karşılık gelir. Test edilmiş sert gözeneksiz yüzeyler steril plastik, cam ve seramiktir. Yayıldıkten sonra bakteriler 15 dakika kurumaya bırakıldı; daha sonra, PBS ile seyreltilmiş faj preparatları, 50 cm³'lik bir hacimde düzungün bir şekilde uygulandı, 24 cm² kirlenmiş alanı kaplayacak kadar, ardından oda sıcaklığında 10 dakikadan fazla olmayan bir süre boyunca kurutuldu. Yalnızca PBS kullanılarak sahte tedaviler gerçekleştirilirken, bir kimyasal dezenfektan (denatüre etanol) kullanılarak pozitif kontrol tedavileri yapıldı.

Oda sıcaklığında 1, 3, 6 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra, yüzeyler uygun seçici ortamı içeren temas Rodac plakaları uygulanarak örnekleni. Yapay olarak kontamine olmuş yüzeylerdeki artık bakteriyel CFU, daha sonra 37 ° C'de 24 saat inkübasyondan sonra yetiştiirilen kolonileri numaralandırarak ölçüldü.

Sonuçlar, fajların, bakteri yoğunluğu nispeten düşük olsa bile kirlenmiş yüzeylerdeki canlı bakteri hücrelerini verimli bir şekilde azaltabildiğini gösterdi, sahte yüzeyle işlemenden bağımsız olarak, yüzey türünden bağımsız olarak% 90 ± 8'e kadar bir azalma ile (seramik, plastik, cam) ve bakteri türleri (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) (Şekil 2). Kontrollere kıyasla anlamlı bir azalma, 10 MOI'de tedaviden 1 saat sonra tespit edildi (-40 ± 15, p <0.05). Fag verimliliği artan MOI ile arttı, test edilen her zaman (p <0.01) 10 ve daha yüksek MOI'ler (100-1000) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı, oysa 100 ve 1000 MOI arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

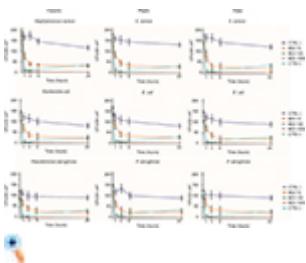


Figure 2 Reduction of bacterial load on different types of hard surfaces treated with specific phages. One hundred CFU of each ATCC bacterial strain (*S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*) were spread on the indicated sterile surfaces, allowed to dry, and subsequently treated with the specific phages, suspended in PBS, at the indicated MOI. After 1, 3, 6, and 24 hours at room temperature, residual viable cells were measured by Rodac sampling with specific selective media and subsequent CFU count after 24 hours of incubation at 37°C. Negative CTR(-) samples were treated with PBS alone. Positive CTR(+) samples were treated with denatured alcohol. Results represent the mean ± SD of triplicate samples in two independent assays per bacterial target.

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CFU, colony forming units; PBS, phosphate-buffered saline; MOI, multiplicity of infection; CTR, control.

Şekil 2 Belirli fajlarla muamele edilmiş farklı sert yüzeylerdeki bakteri yükünün azaltılması. Her ATCC bakteri suşunun yüz CFU'su (*S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*) belirtilen steril yüzeylere yayıldı, kurumaya bırakıldı ve daha sonra belirtilen MOI'de PBS içinde süspansiyon edilen spesifik fajlarla işlendi. Oda sıcaklığında 1, 3, 6 ve 24 saat sonra, kalan canlı hücreler, spesifik seçici ortam ile Rodac örneklemeye ile ölçülmüş ve daha sonra 37 ° C'de 24 saat inkübasyondan sonra CFU sayımı ile ölçülmüştür. Negatif TO (-) numuneleri sadece PBS ile muamele edildi. Pozitif TO (+) numuneleri denatüre alkol ile muamele edildi. Sonuçlar, bakteri hedefi başına iki bağımsız tahlilde üçlü numunelerin ortalama ± SD'sini temsil eder.

Kısaltmalar: ATCC, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu; CFU, koloni oluşturan birimler; PBS, fosfat tamponlu salin; MOI, enfeksiyon çokluğu; TO, kontrol

Phage activity also increased with time, as almost no survivors were detected after 6 hours, when using 1000 MOI, and the reduction was maintained in the subsequent 24 hours. By contrast, disinfectant-treated control surfaces showed an evident drop of bacterial cell number within the first 3–6 hours, followed by new

detection of viable bacteria after 24 hours, suggesting a bacteriostatic effect, rather than true bacterial killing, had occurred on the surfaces.

Faj aktivitesi zamanla artmıştır, çünkü 1000 MOI kullanıldığından 6 saat sonra hayatı kalanlar saptanmamıştır ve sonraki 24 saat içinde azalma sağlanmıştır. Buna karşılık, dezenfektanla muamele edilmiş kontrol yüzeyleri ilk 3-6 saat içinde belirgin bir bakteri hücre sayısı düşüşü gösterdi, ardından 24 saat sonra yeni bakteri bakterisi tespiti yapıldı; bu, gerçek bakteriyel öldürme yerine bakteriyostatik bir etki meydana getirdiğini gösterdi. yüzeyler.

Phage effectiveness against MDR isolates spread on hard surfaces

Based on the results obtained on ATCC strains, phage activity was assessed using wild-type drug-resistant *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* isolates, collected from hospital surfaces.

The assays were performed as done for ATCC strains, using an MOI of 1000 and testing all different types of surfaces (ceramic, plastic, glass). Results showed that phages significantly reduced also MDR bacteria on treated surfaces ([Figure 3](#)), with no significant differences in the percentage of reduction of drug-resistant strains compared to ATCC strains. In addition, no differences were observed among the different types of hard surfaces used.

MDR izolatlarına karşı sert etkilere yayılmış faj etkinliği

ATCC suşlarında elde edilen sonuçlara dayanarak, faj aktivitesi, hastane yüzeylerinden toplanan, vahşi tip ilaca dirençli *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* izolatları kullanılarak değerlendirildi. Testler, ATCC suşları için, 1000 MOI kullanılarak ve tüm farklı yüzey türlerinin (seramik, plastik, cam) test edildiği şekilde yapıldı. Sonuçlar, fajların, işlenmiş yüzeylerdeki MDR bakterilerini de önemli ölçüde azalttığını gösterdi ([Şekil 3](#)), ATCC suşlarına kıyasla ilaca dirençli suşların azalması yüzdesinde anlamlı bir fark yoktu. Ayrıca, kullanılan farklı sert yüzey tipleri arasında fark gözlenmedi.

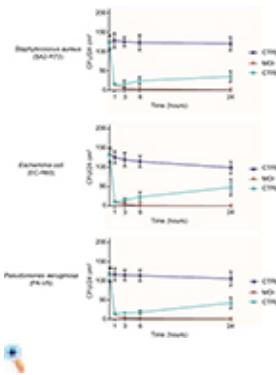


Figure 3 Reduction of MDR hospital isolates on hard surfaces treated with specific phages. One hundred CFU of each bacterial isolate (wild-type *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* strains) were spread on ceramic, plastic, or glass surfaces, allowed to dry, and subsequently treated with the specific phages, suspended in PBS, at 1000 MOI. After 1, 3, 6, and 24 hours at room temperature, residual viable cells were measured by Rodac sampling with specific selective media, and subsequent CFU count after 24 hours of incubation at 37°C. Negative CTR(–) samples were treated with PBS alone. Positive CTR(+) samples were treated with denatured alcohol. Results represent the mean of triplicate samples in two independent experiments, for each surface type. As no significant differences were observed between surface types, graphed values represent the mean ± SD of all the measured samples (18 total samples).

Abbreviations: MDR, multidrug-resistant; CFU, colony forming units; PBS, phosphate-buffered saline; MOI, multiplicity of infection; CTR, control.

Şekil 3 Belirli fajlarla muamele edilen sert yüzeylerde MDR hastane izolatlarının azaltılması. Her bakteri izolatinin (CF-türü *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşları) yüz CFU'su seramik, plastik veya cam yüzeylere yayılmış, kurumasına izin verilmiş ve daha sonra içinde belirli fajlarla muamele edilmiştir. PBS, 1000 MOI'de. Oda sıcaklığında 1, 3, 6 ve 24 saat sonra, kalan canlı hücreler spesifik seçici ortam ile Rodac örneklem ile ölçülmüş ve daha sonra 37 ° C'de 24 saat inkübasyondan sonra CFU sayımı yapılmıştır. Negatif TO (-) numuneleri sadece PBS ile muamele edildi. Pozitif TO (+) numuneleri denatüre alkol ile muamele edildi. Sonuçlar, her yüzey tipi için iki bağımsız deneyde üç kopya numunelerin ortalamasını temsil eder. Yüzey tipleri arasında anlamlı bir fark görülmediğinden, çizilen değerler ölçülen tüm örneklerin ortalama ± SD'sini (toplam 18 örnek) temsil eder.

Kısaltmalar: MDR, çoklu ilaca dirençli; CFU, koloni oluşturan birimler; PBS, fosfat tamponlu salin; MOI, enfeksiyon çokluğu; TO, kontrol

Phage stability in probiotic detergent

As one objective of this study was to determine whether phages could be used as decontaminants during routine sanitation procedures performed in hospital cleaning, we tested phage stability in the eco-sustainable detergent (PCHS), containing spores of probiotic *Bacilli* and already used for routine cleaning of hospital surfaces in several Italian hospitals (Copma). Prior to use, concentrated PCHS detergent (pH =8.4) was diluted 1:100 in sterile water, as indicated by the manufacturer, and used to suspend phages at 10⁷ PFU/mL. Phage stability was measured after 1, 2, 3, and 7 days of incubation at room temperature, by PFU titration on the specific bacterial targets, after removing the *Bacilli*/component by centrifugation. The results showed that phages retained 100% activity even after 7 days after dilution ([Figure 4](#)). Indeed, both the number and diameter of lysis plaques obtained with phages in PCHS were larger on the same tested bacterial strains, compared to those obtained with phages in PBS, although the differences were not statistically significant ([Table 2](#)).

Probiyotik deterjanlarda faj stabilitesi

Bu çalışmanın bir amacı, fajların hastane temizliğinde yapılan rutin sanitasyon prosedürleri sırasında dekontaminant olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlemekti, probiyotik *Bacilli* sporlarını içeren ve halihazırda rutin temizlik için kullanılan eko-sürdürülebilir deterjan (PCHS) içerisinde faj stabilitesini test etti.

birkaç İtalyan hastanesinde (**Copma**) hastane yüzeyleri. Kullanımdan önce konsantre PCHS deterjan (pH = 8.4), üretici tarafından belirtildiği gibi steril suda 1: 100 oranında seyreltildi ve fajları 107 PFU / mL'de askiya almak için kullanıldı. Faj stabilitesi oda sıcaklığında 1, 2, 3 ve 7 günlük inkübasyondan sonra, belirli bakteri hedeflerine PFU titrasyonu ile, Bacilli bileşenini santrifüjleme ile çıkardıktan sonra ölçülmüştür. Sonuçlar fajların seyreltmeden 7 gün sonra bile% 100 aktivite koruduğunu göstermiştir (Şekil 4). Gerçekten de, PCHS'de fajlarla elde edilen lizis plaklarının sayısı ve çapı, aynı test edilen bakteri suşlarında, PBS'de fajlarla elde edilenlere kıyasla daha büyütü, ancak farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (**Tabello 2**).

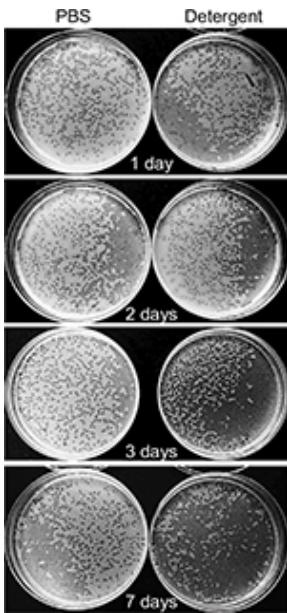


Figure 4 Phage stability in PCHS detergent. Phage stocks were suspended in PBS or in PCHS detergent diluted in water as indicated by the manufacturer, and kept at room temperature in closed plastic tubes for 1, 2, 3, or 7 days. After the indicated times, aliquots were collected and titrated by PFU counting on the corresponding ATCC bacterial target. Samples were performed in duplicate. Pictures refer to anti-*E. coli*phages. Superimposable results were obtained with the phages directed against *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; PCHS, Probiotic Cleaning Hygiene System; PFU, plaque forming units; PBS, phosphate-buffered saline.

Şekil 4 PCHS deterjanında faj stabilitesi. Faj stokları, üretici tarafından belirtildiği gibi suyla seyreltilmiş PBS'de veya PCHS deterjanında süspansedildi ve oda sıcaklığında, kapalı plastik tüplerde 1, 2, 3 veya 7 gün boyunca tutuldu. Belirtilen sürelerden sonra, alikotlar toplandı ve karşılık gelen ATCC bakteri hedefinde sayılan PFU tarafından titre edildi. Numuneler iki kopya halinde gerçekleştirildi. Resimler anti-E'ye aittir. kolifajlarının bulunduğu gruptan seçilmişdir. Süper atılabilir sonuçlar, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya yönelik fajlarla elde edildi.

Kısaltmalar: ATCC, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu; PCHS, Probiyotik Temizlik Hijyen Sistemi; PFU, plak oluşturma birimleri; PBS, fosfat tamponlu salin.

Bacteriophage type	Bacteriophage titer ^a	
	PBS	PCHS
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.7±1.9	8.5±1.3
<i>Escherichia coli</i>	7.6±2.0	8.4±1.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.8±1.8	8.6±2.0

Table 2 PFU titration of phage preparation in detergent and PBS

Notes: ^aPhages were titrated by soft agar method after 7 days in PBS or PCHS solution. Results are expressed as mean PFU ± SD × 10⁶/mL in triplicate experiments.

Abbreviations: PBS, phosphate-buffered saline; PCHS, Probiotic Cleaning Hygiene System; PFU, plaque forming units; ns, not significant.

Tablo 2 Deterjan ve PBS'de faj preparasyonunun PFU titrasyonu

Notlar: aPhages, 7 gün sonra PBS veya PCHS çözeltisinde yumuşak agar usulüyle titre edildi. Sonuçlar, üçlü deneylerde ortalama PFU ± SD x 10⁶ / mL olarak ifade edilir.

Kısaltmalar: PBS, fosfat tamponlu salin; PCHS, Probiyotik Temizlik Hijyen Sistemi; PFU, plak oluşturma birimleri; ns, anlamlı değil.

Phage/probiotic decontaminating effectiveness “in situ”

Since previous results showed that probiotic-based PCHS detergents were able to gradually and stably abate pathogens on surfaces,²⁸ based on results showing phage stability in PCHS detergent, we wanted to assess the effectiveness of a combined phage–probiotic detergent in reducing bacterial load on surfaces. To this aim, we performed decontamination assays *in situ*, using *S. aureus* as the target pathogen. Briefly, a 10² CFU/mL culture of *S. aureus* was uniformly spread on the ceramic sink of an isolated bathroom, allowed

to dry for 24 hours, and then treated by spraying PCHS detergent alone, or added with 10^5 PFU/mL of anti-staphylococcal phages, corresponding to 1000 MOI.

The detergent solution sprayed on the tested surfaces was kept low enough to dry completely in <10 minutes, mimicking routine surface cleaning. After treatment, surface contamination was assayed by application of Baird-Parker Rodac plates after 1 hour, and 1, 3, and 15 days. Both *S. aureus* and PCHS-*Bacilli* can grow on Baird-Parker agar, being, however, clearly distinguishable as *S. aureus* originates black round colonies surrounded by a clear zone, whereas *Bacilli* give rise to irregular gray-brown colonies.

Collected results, summarized in [Figure 5](#), confirmed that phage treatment alone significantly reduced bacterial CFU at early times post treatment ($90 \pm 5\%$ at 1 and 24 hours after treatment) ($p < 0.01$), as already observed in in vitro assays. However, the reduction was not maintained at later times (15 days), likely due to the loss of intact and therefore infectious phages on the surface. By contrast, probiotics alone, began to be active after 3 days, as expected, with a maximum reduction of $75 \pm 6\%$ at 15 days after application. Interestingly, the combined use of phages and probiotics resulted not only in a rapid reduction of the target bacteria ($94 \pm 4\%$ within 1 hour), but also in the persistence of CFU reduction even after 15 days ($99 \pm 1\%$). The graph in [Figure 6](#) represents the CFU amount detected in in situ assays following the application of phage, probiotic, or phage-probiotic-based compounds.

Faj / probiyotik dekontamine edici etkinliği “yerinde”

Önceki sonuçlar, probiyotik bazlı PCHS deterjanlarının, PCHS deterjanında faj stabilitesini gösteren sonuçlara dayanarak 28 yüzeyde patojenleri kademeli olarak ve stabil bir şekilde azalttığını gösterdiğinden, kombinasyonlu faj-probiyotik deterjanın, bakteriyel yükü azaltmadaki etkinliğini değerlendirmek istedik. yüzeyler. Bu amaçla, hedef patojen olarak *S. aureus* kullanarak yerinde dekontaminasyon deneyleri yaptıktı. Kısaca, 102 CFU / mL'lik bir *S. aureus* kültürü izole bir banyonun seramik lavabosuna eşit bir şekilde yayıldı, 24 saat kurumaya bırakıldı ve sonra PCHS deterjanının tek başına püskürtülmesiyle muamele edildi veya 105 PFU / mL anti- 1000 MOI'ye karşılık gelen stafilocokal fajlar. Test edilen yüzeylere püskürtülen deterjan çözeltisi, rutin yüzey temizliğini taklit eden tamamen <10 dakikada kuruması için yeterince düşük tutuldu. Muameleden sonra, Baird-Parker Rodac plakaların 1 saat ve 1, 3 ve 15 gün sonra uygulanmasıyla yüzey kirliliği denenmiştir. Hem *S. aureus* hem de PCHS-*Bacilli*, Baird-Parker ağacı üzerinde büyütülebilir, ancak *S. aureus* orijinal bir bölge ile çevrili siyah yuvarlak kolonileri belirlerken açıkça belirgin olarak ayırt edilirken, *Bacilli* düzensiz gri-kahverengi kolonilere yol açar. Şekil 5'te özetlenen toplanan sonuçlar, faj işleminin tek başına tedavi sonrası erken zamanlarda bakteriyel CFU'yu önemli ölçüde azalttığını doğruladı (tedaviden sonra 1 ve 24 saatte% 90 ± 5) (daha önce in vitro analizlerde gözlendiği gibi) ($p < 0.01$). Bununla birlikte, azalma, yüzeydeki bozulmamış ve bu nedenle enfeksiyöz fajlar nedeniyle, daha sonraki zamanlarda (15 gün) sürdürülmemiştir. Buna karşılık, tek başına probiyotikler, bekleniği gibi 3 gün sonra, uygulamadan 15 gün sonra maksimum% $75 \pm 6\%$ 'lik bir azalma ile aktif olmaya başladı. İlginç bir şekilde, fajların ve probiyotiklerin birleşik kullanımı, sadece hedef bakterilerin hızlı bir şekilde düşmesine neden olmadı (1 saat içinde% 94 ± 4), ayrıca 15 gün sonra bile (% 99 ± 1) CFU azalmasının devam etmesiyle sonuçlandı. [Şekil 6](#)'daki grafik, faj, probiyotik veya faj probiyotik bazlı bileşiklerin uygulanmasını takiben in situ analizlerde tespit edilen CFU miktarını gösterir.

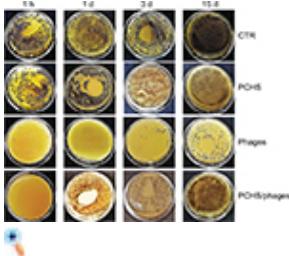


Figure 5 Reduction of *Staphylococcus aureus* contamination in situ, by a combined phage–probiotic detergent. About 100 CFU of *S. aureus* (ATCC strain) per 24 cm² were uniformly spread on the surface of a ceramic sink. After 24 hours, the artificially contaminated surface was treated with water (CTR), probiotic detergent alone (PCHS), anti-staphylococcal phages in PBS alone (phages), or probiotic detergent including anti-staphylococcal phages (PCHS + phages). Phages were used at 1000 MOI. After 1 hour, and 1, 3, and 15 days, surfaces were sampled by Baird–Parker Rodac plates, and residual *S. aureus* viable cells were counted by enumerating black round colonies after 24 hours of incubation at 37°C. PCHS-Bacilli gave rise to gray-brown irregular colonies on Baird–Parker medium, easily distinguishable from the *S. aureus* ones. Results are representative of duplicate samples in three independent experiments.

Abbreviations: h, hours; d, days; ATCC, American Type Culture Collection; PCHS, Probiotic Cleaning Hygiene System; CFU, colony forming units; PBS, phosphate-buffered saline; MOI, multiplicity of infection; CTR, control.

Şekil 5 Kombine bir faj-probiyotik deterjanla yerinde *Staphylococcus aureus* kontaminasyonunun azaltılması. 24 cm² başına yaklaşık 100 CFU *S. aureus* (ATCC suyu), bir seramik lavabonun yüzeyine düzgün bir şekilde yayıldı. 24 saat sonra, yapay olarak kontamine olmuş yüzey, su (CTR), sadece PBS içinde yalnızca probiyotik deterjan (PCHS), anti-stafilocok fajları (sadece PJ'ler) veya anti-stafilocokal fajlar (PCHS + fajlar dahil) içeren probiyotik deterjan ile muamele edildi. Fajlar, MOI'de 1000 kullanılmıştır. 1 saat ve 1, 3 ve 15 gün sonra, yüzeyler Baird-Parker Rodac plakaları ile örmeklendi ve artık *S. aureus* canlı hücreleri, 37 ° C'de 24 saat inkübasyondan sonra siyah yuvarlak kolonilerin sayılmasıyla sayıldı. PCHS-Bacilli, Baird-Parker ortamında, *S. aureus*'lardan kolayca ayırt edilebilen gri-kahverengi düzensiz kolonilere yol açtı. Sonuçlar, kopya numunelerin üç bağımsız deneyde temsilidir.
Kısaltmalar: saat, saat; d, günler; ATCC, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu; PCHS, Probiyotik Temizlik Hijyen Sistemi; CFU, koloni oluşturan birimler; PBS, fosfat tamponlu salın; MOI, enfeksiyon çokluğu; TO, kontrol

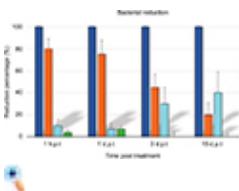


Figure 6 Average reduction of *Staphylococcus aureus* contamination in situ, by a combined phage–probiotic detergent. Surfaces were artificially contaminated with *S. aureus* and subsequently treated as described in Figure 5. Results are expressed as mean value \pm SD of duplicate samples from three independent experiments. CTR, water; PCHS, probiotic detergent alone; phages, anti-staphylococcal phages in PBS alone; PCHS + phages, probiotic detergent including anti-staphylococcal phages.

Abbreviations: PCHS, Probiotic Cleaning Hygiene System; PBS, phosphate-buffered saline; CTR, control; h.p.t, hours post treatment; d.p.t, days post treatment.

Şekil 6 Kombine bir faj-probiyotik deterjan ile yerinde *Staphylococcus aureus* kontaminasyonunun ortalama azalması. Yüzeyler yapay olarak *S. aureus* ile kirlenmiş ve daha sonra Şekil 5'te tarif edildiği gibi muamele edilmiştir. Sonuçlar, üç bağımsız deneyden elde edilen kopya numunelerin ortalama değeri \pm SD olarak ifade edilmiştir. TO, su; PCHS, sadece probiyotik deterjan; fajlar, sadece PBS'de anti-stafilocokal fajlar; PCHS + fajlar, anti-stafilocokal fajlar dahil probiyotik deterjan.

Kısaltmalar: PCHS, Probiyotik Temizlik Hijyen Sistemi; PBS, fosfat tamponlu salin; TO, kontrol; h.p.t, işleminden sonraki saatler; d.p.t, işleminden sonraki günler.

Discussion

Phages have been repeatedly suggested as potential decontaminating agents against foodborne pathogens on food and food processing surfaces,^{32–34} leading to approval by the FDA of the use of phages for decontamination from the food pathogen *L. monocytogenes*.³² More recently, the emergence of increasing antibiotic-resistant bacterial pathogens has directed attention on methods capable of controlling their spread and growth, both in infected subjects and surfaces of health care settings. Toward this aim, phages have been recently tested against drug-resistant strains of *E. coli* and *S. aureus*, showing good activity on surfaces and fomites,^{32,35,36} and suggesting their potential use as disinfectants substitutes or disinfectants supplements.

Although promising, most reported phage-based studies appear barely applicable in routine sanitation, as prolonged contact between phages and target bacteria in aqueous solution is generally needed,³² consequently needing that surfaces remain wet for a long time, that is not compatible with inpatients presence. In addition, in vitro phage activity was tested on highly contaminated surfaces, using bacterial densities (around 10^8 CFU/m²), which facilitate the encounter between phages and target bacteria,³⁶ but are not consistent with what is found on health care settings surfaces, where the mean level of contamination is 3–5 logs lower (around 10^3 – 10^5 CFU/m²). This implies that, to be predictive, in vitro tests should be performed using bacterial amounts comparable to those detectable on hospital surfaces. Interestingly, however, a recent paper reported a decrease of *Acinetobacter baumannii* infections upon using the application by aerosol of specific anti-*Acinetobacter* phages in addition to chlorine-based disinfection for terminal sanitation of intensive care unit (ICU) rooms,⁴¹ suggesting they might be used effectively to reduce specific pathogens in hospital rooms, although the modality used for phage application was only compatible with sporadic use, such as during terminal sanitation, when the room is empty. Also, a high-phage

concentration was used to treat a small space, and no information about the relative abundance of the bacterial target and the specific bacteriophages was available, rendering it difficult to draw a conclusion about the possible general use of phages in routine sanitation. On the other hand, a probiotic-based sanitation procedure has been shown to stably abate surface pathogens,^{28–30} potentially controlling a high number of HAI-associated pathogens. The system, named PCHS, consists in a mild eco-friendly chemical detergent added with spores of *Bacillus* probiotics. Due to the action, essentially based on competitive antagonism mechanisms, PCHS effects are slow and not specific.

Based on the promising and complementary characteristics of bacteriophages and probiotics, the aim of this study was to analyze the stability of phages in the PCHS detergent, to ascertain the feasibility of a combined phage/probiotic sanitation in routine protocols used for hospital environments.

To this purpose, we used some of the HAI-associated pathogens most frequently detected as persistent contaminants on hospital surfaces, namely *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*, as target bacteria. Tested hard surfaces included ceramic, plastic, and glass, as these surface typologies are often present in hospital rooms and environment. Furthermore, as hospital pathogens are often MDR, because of the selective pressure exerted by the use of antibiotics, we also examined phage ability to eliminate drug-resistant strains of *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. Such strains were isolated from hospital surfaces, thus representing more closely what can be actually found in hospital environments.

To mimic bacterial densities comparable to those found on hospital surfaces, target bacteria were seeded at 100 CFU/24 cm², corresponding to 4×10^4 CFU/m², representing a realistic contamination value, based on previous studies.²⁹ In addition, to imitate what is done during sanitation procedures, we kept the contact time between phages and bacteria in water solution as low as far as possible, using phage volumes drying in a maximum time of 10 minutes.

The results showed that phages can be active in decontaminating all the types of hard surfaces tested, without any detectable difference between surface types and bacterial strains, indicating that phages in vitro are active in removing pathogen levels similar to those detected on field on hospital surfaces. In addition, phages proved to be comparably active against MDR hospital isolates, highlighting their ability to eliminate drug-resistant pathogens, not only in infected subjects, where bacterial concentration and growth rate are high, but also on inanimate surfaces, where the bacterial density and growth rate are sensibly lower.

Notably, phages not only retained their full activity when suspended in PCHS detergent at work dilution, but indeed also exhibited stronger antibacterial activity compared to that observed when phages are suspended in PBS. This suggests that the cleaning chemicals contained in the eco-friendly probiotic detergent might somehow stabilize phages at room temperature, favor the contact between phage and bacterial targets, or facilitate the entrance/action of phages in the bacterial cell.

Consistently with the results obtained in vitro, as well as with previous observations conducted with probiotic-detergent on hospital surfaces, in situ assays showed that the combined probiotic-phage application resulted in remarkable decontaminating activity, compared to the individual probiotic and phage components alone. In fact, viable bacterial targets dropped very rapidly (within 1 hour), in contrast to what was observed with probiotics alone, likely as a consequence of the killing ability of phages. By contrast, contrarily to what was observed with phages alone, bacterial contamination was maintained stably low for a prolonged time interval (till 2 weeks, representing the assay time end), likely due to the stabilizing action of

the probiotic component of the detergent, that, acting by competitive inhibition of target bacteria, is able to overcome the problem associated to loss of infectivity of phages on treated surfaces.

Tartışma

Fajlar, gıda ve gıda işleme yüzeylerinde gıda kaynaklı patojenlere karşı potansiyel dekontamine edici ajanlar olarak defalarca önerilmiş olup, 32-34, gıda patojeni L. monositojenlerinden dekontaminasyon için faj kullanımının FDA tarafından onaylanması yol açmıştır.³⁷ Daha yakın bir zamanda, antibiyotiğe dirençli bakteriyel patojenlerin artması, hem enfekte olmuş kişilerde hem de sağlık bakımı ortamlarının yüzeylerinde yayılmalarını ve büyümelerini kontrol edebilen yöntemlere dikkat çekti. Bu amaca yönelik olarak fajlar, yakın zamanda E. coli and S. aureus'un ilaca dirençli suşlarına karşı test edildi, yüzeyler ve fomitler üzerinde iyi aktivite gösterildi, 32,35,36 ve dezenfektanların yerine geçenler veya dezenfektanların takviyeleri olarak potansiyel kullanımlarını öne sürdürüler.

Ümit verici olsa da, rapor edilen faja dayalı çalışmaların çoğu, rutin sanitasyonda zar zor uygulanabilir görünmektedir, çünkü sulu çözelti içerisinde fajlar ve hedef bakteriler arasında uzun süreli temas genellikle gereklidir, bunun sonucunda, yüzeyin uzun süre ıslak kalması, bunun için yatarak tedavi edilmesi gerekmektedir. . Ek olarak, in vitro faj aktivitesi, fajlarla hedef bakteriler arasında karşılaşmayı kolaylaştırır, ancak 36 sağlık bakımı ortamlarında bulunanlarla tutarlı olmayan bakteri yoğunlukları (yaklaşık 108 CFU / m²) kullanılarak yüksek derecede kontamine olmuş yüzeylerde test edilmiştir, ortalama kirlilik seviyesinin 3–5 olduğu durumlarda, kütükler daha düşüktür (yaklaşık 103–105 CFU / m²). Bu, öngörücü olması için, hastane yüzeylerinde saptanabilenlere benzer bakteriyel miktarlar kullanılarak in vitro testlerin yapılması gereği anlamına gelir. Bununla birlikte, ilginç bir şekilde, yeni bir makale, yoğun bakım ünitesinin (ICU) odalarının terminal temizliği için klor bazlı dezenfeksiyonun yanı sıra spesifik Acinetobacter fajlarının aerosolü ile uygulanmasının ardından Acinetobacter baumannii enfeksiyonlarının azaldığını bildirmiştir, faj uygulaması için kullanılan yöntem sadece oda boşken terminal sanitasyonda olduğu gibi sporadik kullanımla uyumlu olmasına rağmen, hastane odalarındaki spesifik patojenleri etkin bir şekilde azaltmak için etkilidir. Ayrıca, küçük bir alanı tedavi etmek için yüksek faj konsantrasyonu kullanıldı ve bakteriyel hedefin göreceli bolluğu ve spesifik bakteriyofajlar hakkında hiçbir bilgi mevcut değildi, bu da fajların rutin sanitasyonda olası genel kullanımı hakkında bir sonuç çıkarılmasını zorlaştırdı. . Öte yandan, probiyotik bazlı bir sanitasyon prosedürüne yüzey patojenlerini stabil bir şekilde azalttığı, potansiyel olarak yüksek sayıda HAI ile ilişkili patojeni kontrol eden 28-30 olduğu gösterilmiştir. PCHS adı verilen sistem, Bacillus probiotics sporları ile eklenen hafif, çevre dostu kimyasal bir deterjandan oluşur. Eylem nedeniyle, esasen rekabetçi düşmanlık mekanizmalarına dayanarak, PCHS etkileri yavaş ve spesifik değildir. akteriyofajların ve probiyotiklerin ümit verici ve tamamlayıcı özelliklerine dayanarak, bu çalışmanın amacı, PCHS deterjanındaki fajların stabilitesini analiz etmek, hastane ortamlarında kullanılan rutin protokollerde kombine faj / probiyotik sanitasyonunun uygulanabilirliğini tespit etmektir.

Bu amaçla, hastane yüzeylerinde kalıcı kirletici madde olarak en sık tespit edilen HAI ile ilişkili bazı patojenleri hedefledik, örneğin S. aureus, E. coli ve P. aeruginosa. Test edilen sert yüzeyler seramik, plastik ve cam içermekteydi, çünkü bu yüzey tipolojileri genellikle hastane odalarında ve ortamda bulunur. Ayrıca, hastane patojenleri sıklıkla MDR olduğundan, antibiyotiklerin kullanımıyla uygulanan selektif basınç nedeniyle, ayrıca S. aureus, E. coli ve P. aeruginosa'nın ilaca dirençli suşlarını ortadan kaldırmak için faj yeteneğini de inceledik. Bu tür suşlar hastane yüzeylerinden izole edilmiştir, bu nedenle hastane ortamlarında gerçekten ne bulunabileceğini daha yakından temsil etmektedir.

Hastane yüzeylerinde bulunanlarla karşılaşılabilir bakteriyel yoğunlukları taklit etmek için, hedef bakteriler, önceki çalışmalara dayanarak gerçekçi bir kirlilik değerini temsil eden, 4 x 104 CFU / m²'ye karşılık gelen 100 CFU / 24 cm²'de tohumlanmıştır.²⁹ sanitasyon prosedürleri sırasında, su çözeltisinde fajlar ve bakteriler arasındaki temas süresini olabildiğince düşük tutuk ve maksimum 10 dakikalık bir sürede faj hacimleri kurutmayı kullanarak yaptı.

Sonuçlar, fajların, test edilen tüm sert yüzey tiplerinin dekontamine edilmesinde aktif olabileceği gösterdi, yüzey tipleri ve bakteri suşları arasında herhangi bir tespit edilebilir fark olmadan, in vitro fajların, hastane yüzeylerinde sahada tespit edilenlere benzer patojen seviyelerinin giderilmesinde aktif olduğunu gösterir. Ek olarak, fajların MDR hastane izolatlarına karşı karşılaştırmalı olarak etkin oldukları kanıtlanmıştır, yalnızca bakteri yoğunluğu ve büyümeye oranının yüksek olduğu virüslü yüzeylerde değil, aynı zamanda bakteri yoğunluğu ve büyümeye oranının yüksek olduğu virüslü yüzeylerde ilaca dirençli patojenleri ortadan kaldırma yeteneklerini vurgulayarak büyümeye hızı oldukça düşüktür.

Özellikle, fajlar, sadece iş seyreltilmesinde PCHS deterjanında süspansedildiklerinde tam aktivitelerini muhafaza etmeyeceğini, fajlar, PBS içerisinde süspansedildiğinde gözlemlenenlere kıyasla daha güçlü antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Bu, çevre dostu probiyotik deterjanda bulunan temizleme kimyasallarının, fajları oda sıcaklığında bir şekilde stabilize edebileceğini, faj ve bakteriyel hedefler arasındaki teması destekleyeceğini veya fajların bakteri hücresindeki girişini / etkisini kolaylaştırabileceğini göstermektedir. İn vitro elde edilen sonuçlarla ve hastane yüzeylerinde probiyotik-deterjanla yapılan önceki gözlemlerde olduğu gibi, yerinde analizler, kombine probiyotik-faj uygulamasının, tek tek probiyotik ve faj bileşenlerine kıyasla dikkate değer bir dekontamine edici aktivite ile sonuçlandığını göstermiştir. Aslında, uygulanabilir bakteriyel hedefler, fajların öldürme kabiliyetinin bir sonucu olarak, sadece probiyotiklerle gözlenenlerin aksine, 1 saat

İçinde çok hızlı bir şekilde düşmüştür. Aksine, yalnızca fajlarla gözlenenlerin aksine, bakteriyel kontaminasyon, deterjanın probiyotik bileşeninin dengeleyici etkisinden dolayı, muhtemelen, deterjanın probiyotik bileşeninin dengeleyici etkisinden dolayı, uzun bir süre boyunca (deney süresinin sonunu temsil eden 2 haftaya kadar) stabil bir şekilde düşük tutuldu. Hedef bakterilerin rekabetçi inhibisyonuyla hareket ederek, fajların muamele edilen yüzeylerde enfektivite kaybına bağlı problemin üstesinden gelebilir.

Conclusion

Our data indicate that a phage/probiotic detergent might be suitable for use as routine sanitizing agent. This, especially in consideration of the high proportion of antibiotic-resistant isolates on hospital surfaces, opens new perspectives for the development of innovative products and systems aimed at the prevention of HAIs transmitted by contaminated surfaces in the hospital environment.

Sonuç

Verilerimiz, bir faj / probiyotik deterjanın rutin temizleme maddesi olarak kullanım için uygun olabileceğini göstermektedir. Bu, özellikle hastane yüzeylerinde yüksek oranda antibiyotiğe dirençli izolat kullanılması dikkate alındığında, hastane ortamında kirlenmiş yüzeyler tarafından iletilen HAI'lerin önlenmesine yönelik yenilikçi ürün ve sistemlerin geliştirilmesi için yeni bakış açıları ortaya koymaktadır.

Data availability

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

Veri kullanılabilirliği Bu makalenin sonucunu destekleyen veri setleri makale ve ek dosyalarında yer almaktadır.

Acknowledgments

We thank Dr Mzia Kutateladze for critical revision of the manuscript. We thank Iva Pivanti and Maddalena Coccagna for the excellent technical support. We acknowledge the assistance offered by Linda Sartor for revising the English manuscript.

Teşekkür

Mzia Kutateladze'ye yazının eleştirel revizyonu için teşekkür ediyoruz. Mükemmel teknik destek için Iva Pivanti ve Maddalena Coccagna'ya teşekkür ediyoruz. İngilizce makaleyi gözden geçirmek için Linda Sartor tarafından sunulan yardımları kabul ediyoruz.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combescure C, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2011;377(9761):228–241.
2. Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Diaz Höglberg L. *Point Prevalence Survey of Healthcare Associated Infections And Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals.* Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control; 2013.
3. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect.* 2007;65(Suppl 2):50–54.

4. Mitchell BG, Dancer SJ, Anderson M, Dehn E. Risk of organism acquisition from prior room occupants: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect*. 2015;91(3):211–217.
5. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis*. 2004;39(8):1182–1189.
6. Dancer SJ. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):665–690.
7. 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):687–699.
8. Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect*. 2009;73(4):378–385.
9. Weber DJ, Anderson D, Rutala WA. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(4):338–344.
- 1 Weber DJ, Rutala WA. Role of environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18(5):306–309.
- 1 Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, Clostridium difficile, and Acinetobacter species. *Am J Infect Control*. 2010;38(5 Suppl 1):S25–S33.
- 1 Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006;6:130.
- 1 DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2464–2474.
- 1 Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis*. 2001;32(Suppl 2):S114–S132.
- 1 McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, et al. Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(9):3804–3811.
- 1 Jamal M, Hussain T, Rajanna Das C, Andleeb S. Isolation and characterization of a myoviridae MJ1 bacteriophage against multi-drug resistant *Escherichia coli* 3. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(11):e25917.
- 1 Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG Jr, van Duin D. Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality associated with bloodstream infections caused by *pseudomonas aeruginosa* compared to other bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(6):e02671–16.
- 1 Palacios-Baena ZR, Gutierrez-Gutierrez B, De Cueto M, et al. Development and validation of the INCREMENT-ESBL predictive score for mortality in patients with bloodstream infections due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(3):906–913.
- 1 WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available from: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. Accessed April 4, 2018.

- 2 Bock LJ, Wand ME, Sutton JM. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and adapted strains. *J Hosp Infect*. 2016;93(1):42–48.
- 2 Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(1):e01162-16.
- 2 Cornejo-Juarez P, Vilar-Compte D, Perez-Jimenez C, Namendys-Silva SA, Sandoval-Hernandez S, Volkow-
2 Fernandez P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J Infect Dis*. 2015;31:31–34.
- 2 Caini S, Hajdu A, Kurcz A, Borocz K. Hospital-acquired infections due to multidrug-resistant organisms in Hungary, 2005–2010. *Euro Surveill*. 2013;18(2):20352.
- 2 WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, 2014. 2014. Available from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Accessed April 04, 2018.
- 2 Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch Intern Med*. 2006;166(18):1945–1951.
- 2 Drees M, Snydman DR, Schmid CH, et al. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*. 2008;46(5):678–685.
- 2 Nseir S, Blazejewski C, Lubret R, Wallet F, Courcol R, Durocher A. Risk of acquiring multidrug-resistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(8):1201–1208.
- 2 Caselli E, D'Accolti M, Vandini A, et al. Impact of a probiotic-based cleaning intervention on the microbiota ecosystem of the hospital surfaces: focus on the resistome remodulation. *PLoS One*. 2016;11(2): e0148857.
- 2 Vandini A, Temmerman R, Frabetti A, et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS One*. 2014;9(9):e108598.
- 3 Caselli E. Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings. *Microb Biotechnol*. 2017;10(5):1079–1083.
- 3 Caselli E, Antonioli P, Mazzacane S. Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation. *J Hosp Infect*. 2016;94(2):193–194.
- 3 Abuladze T, Li M, Menetrez MY, Dean T, Senecal A, Sulakvelidze A. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(20):6230–6238.
- 3 Greer GG. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Prot*. 2005;68(5):1102–1111.
- 3 Tomat D, Quiberoni A, Mercanti D, Balague C. Hard surfaces decontamination of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using bacteriophages. *Food Res Int*. 2014;57:123–129.
- 3 Sulakvelidze A. Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections. *Drug Discov Today*. 2005;10(12):807–809.
- 3 Jensen KC, Hair BB, Wienclaw TM, et al. Isolation and host range of bacteriophage with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and potential use as a fomite decontaminant. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131714.

- 3 Regulations C-CoF. Title 21: Food and drugs. Chapter 1: Food and Drug Administration; Department of Health and
7. Human Services. Subchaper B: Food for human consumption. PART 172: Food additives permitted for direct
addition to food for human consumption. Subpart H: Other Specific Usage Additives. Sec. 172.785 Listeria-specific
bacteriophage preparation. 2017. Available from: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2011-title21-vol3/pdf/CFR-2011-title21-vol3-chapI.pdf>. Accessed April 04, 2018.
- 3 EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. October 20, 2017. Available
8. from: <http://www.eucast.org/>. Accessed July 12, 2018.
- 3 CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th edition. 2018. Available from: <https://cls.i.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>. Accessed July 12, 2018.
- 4 Caselli E. Testing antibacterial activity of bacteriophages on hard surfaces. <http://www.protocols.io>. 2018;
0. Available from: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.nwmdfc6. Accessed July 12, 2018.
- 4 Ho YH, Tseng CC, Wang LS, et al. Application of bacteriophage-containing aerosol against nosocomial transmission
1. of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in an intensive care unit. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168380.



This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the [Creative Commons Attribution - Non Commercial \(unported, v3.0\) License](#). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of [our Terms](#).

Download Article [PDF]



Bacteriophages and probiotics can be efficient sanitizing agents.

What is it about?

The so-called hospital-acquired infections are often transmitted by microbes contaminating hospital surfaces, which are also often resistant to drugs, consequently causing infections very hard to treat, responsible of millions deaths in western world. Unfortunately, conventional chemicals-based cleaning is not efficient in eliminating in a stable way such pathogenic microbes, indeed promoting their resistance to disinfectants and drugs. In the attempt to find a method capable of fighting such pathogens, we recently studied a biological approach based on the use of beneficial bacteria, showing that they can abate pathogens without inducing drug-resistances. However, probiotics action is not rapid, nor specific. By contrast, bacteriophages are able to kill specific bacteria very rapidly, but their action is limited in time. Consequently, based on the properties of probiotics and bacteriophages, we wanted to test their combined use as a potential system for eliminating in a stable way the bacteria mainly responsible for hospital infections, with particular attention to drug-resistant ones. Collected results, obtained using an eco-friendly cleanser additioned with bacteriophages and probiotics, showed that this biological approach is effective in stably eliminating surface pathogens, as it combines the rapid and specific action of bacteriophages with the stabilizing and general action of probiotics. This approach open new perspectives in the management of infection control in the hospital environment.

Bakteriyofajlar ve probiyotikler etkili temizlik maddeleri olabilir.

Ne hakkında?

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar, sıklıkla, ilaçlara da dirençli olan hastane yüzeylerini kirleten mikroplar tarafından bulaşır, bu nedenle batı dünyasında milyonlarca ölümden sorumlu olan enfeksiyonların tedavisi çok zordur. Ne yazık ki, konvansiyonel kimyasal bazlı temizleme, bu tür patojen mikropların kararlı bir şekilde giderilmesinde etkili değildir, aslında dezenfektanlara ve ilaçlara karşı dirençlerini arttırır. Bu tür patojenlerle savaşabilecek bir metot bulma girişiminde yakın zamanda, yararlı bakterilerin kullanımına dayanan biyolojik bir yaklaşım üzerinde çalıştık, ilaca direnç göstermeden

patojenleri azaltabileceklerini gösterdi. Bununla birlikte, probiyotikler eylemi hızlı veya spesifik değildir. Buna karşılık, bakteriyofajlar belirli bakterileri çok hızlı bir şekilde öldürübirlirler, ancak zamanla etkileri sınırlıdır. Sonuç olarak, probiyotiklerin ve bakteriyofajların özelliklerine dayanarak, bunların kombine kullanımını, ilaçlara dirençli olanlara özel dikkat göstererek, özellikle hastane enfeksiyonlarından sorumlu olan bakterileri stabil bir şekilde elimine etmek için potansiyel bir sistem olarak test etmek istedik. Bakteriyofajlar ve probiyotiklerle ilave edilen çevre dostu bir temizleyici kullanılarak elde edilen toplanan sonuçlar, bu biyolojik yaklaşımın, bakteriyofajların hızlı ve spesifik etkisini probiyotiklerin dengeleyici ve genel etkisiyle birleştirdiği için, yüzey patojenlerinin stabil bir şekilde giderilmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu yaklaşım hastane ortamında enfeksiyon kontrolünün yönetiminde yeni bakiş açıları açar.

Why is it important?

The use of eco-friendly cleansers additioned with bacteriophages and probiotics can be an efficient biological approach to fight infections and antibiotic resistance.

Neden önemlidir

Bakteriyofajlar ve probiyotiklerle birlikte verilen çevre dostu temizleyicilerin kullanımı enfeksiyonlarla ve antibiyotik direnciyle mücadelede etkili bir biyolojik yaklaşım olabilir.

[Read more on Kudos...](#)