



OGGETTO: Certificazione Sistema Bioster
(Cefla Dental Group, Imola)

INTRODUZIONE

La formazione di biofilm microbico nei condotti idrici dei riuniti dentali è documentata da evidenze inconfutabili (Depaola et al., 2002; O'Donnell et al., 2011) e livelli microbici di 10^4 - 10^5 unità formanti colonia (UFC)/L in campioni idrici sono frequentemente riportati. Tali microrganismi sono generalmente specie ambientali e non patogeni. Tuttavia, patogeni opportunisti quali *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 e *Mycobacterium non turbercolare* sono frequentemente rilevabili (Walker et al., 2004) e sono stati riportati alcuni casi di infezioni direttamente associate a condotti idrici di riuniti dentali contaminati (Pankhurst e Coulter, 2007), tra cui un caso di legionellosi letale verificatosi in Italia, in cui il livello rilevato di contaminazione da *L. pneumonia* sierogruppo 1 in condotti idrici di riuniti dentali era addirittura di 6×10^4 UFC/L (Ricci et al., 2012).

I microrganismi provengono anche dai pazienti che si sottopongono a cure odontoiatriche e possono entrare nei condotti idrici dei riuniti secondo diverse modalità, ad esempio con l'aspirazione di fluidi biologici durante i transitori di pressione negativa che si verificano quando si arresta la rotazione del manipolo turbina dentale. In effetti, in oltre due terzi dei riuniti, sono rilevabili streptococchi orali, marcatori di contaminazione salivare. Benché il livello di contaminazione dei condotti idrici dei riuniti da parte di streptococchi sia generalmente basso (Petti et al., 2013), la presenza di sangue, saliva e altre secrezioni provenienti dai pazienti,



potenzialmente portatori di infezioni ad esempio da HBV, HCV e HIV, non può essere ignorata. Inoltre, patogeni opportunisti, appartenenti ad esempio ai generi *Candida*, *Staphylococcus* ed *Enterococcus*, possono trasmettersi a pazienti immunologicamente compromessi durante le cure dentali (Petti e Tarsitani, 2006; Szymańska e Sitkowska, 2013).

Al fine di superare il problema delle infezioni crociate trasmesse attraverso i condotti idrici del riunito, sono state proposte diverse tecniche, quali il lavaggio con acqua prima del trattamento del paziente e la disinfezione e, tra i metodi di disinfezione, sono disponibili diversi prodotti e sistemi (O'Donnell et al., 2011; Walker e Marsh, 2007).

Il presente è uno studio tecnico sull'attività disinfettante del sistema Bioster (Cefla Dental Group, Imola, Italia) su microrganismi appartenenti a generi che sono generalmente utilizzati per testare l'efficacia dei disinfettanti e sono anche rilevabili in condotti idrici di riuniti.

MATERIAI E METODI

Micro-organismi testati e coltivazione

Sono stati testati i seguenti micro-organismi

- *Staphylococcus aureus*
- *Enterococcus faecalis*
- *Pseudomonas aeruginosa*



- *Mycobacterium chelonae*
- *Candida albicans*
- *Legionella pneumophila* sierogruppo 1
- Spore di *Bacillus clausii*

Per quanto riguarda *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, sono stati prelevati tamponi da pazienti ricoverati presso il Policlinico Umberto I (Roma) e colpiti da infezioni nosocomiali, dovute a microrganismi che sono generalmente resistenti a biocidi e antibiotici e persistenti nell'ambiente (Calfee, 2012). I tamponi sono stati collocati in soluzione salina (9 g/L NaCl) e trasportati alla temperatura di 4°C al Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive dell'Università "La Sapienza" di Roma. Il materiale raccolto è stato poi messo in piastra sui seguenti terreni selettivi:

- Mannitol Salt Agar (MSA –Becton Dickinson Italy, Milano, Italia) per l'isolamento di *S. aureus* e incubato a 37°C per 48 h in aerobiosi;
- Enterococcosel Agar (Becton Dickinson) per l'isolamento di *E. faecalis* e incubato a 37°C per 48 h in aerobiosi;
- Pseudosel Agar (Becton Dickinson) per l'isolamento di *P. aeruginosa* e incubato a 37°C per 48 h in aerobiosi;
- Bismuth Sulphite Glucose Glycine Yeast (BIGGY –Becton Dickinson) Agar per l'isolamento di *C. albicans* e incubato a 30°C per 48 h in aerobiosi;.

Dopo l'incubazione, ceppi con colonie tipiche sono stati sottoposti a colorazione di Gram e identificati attraverso test di suscettibilità biochimica e antibiotica con VITEK 2 (bioMerieux Italy, Firenze, Italia)



L. pneumophila è stata isolata dall'acqua di rete di un vecchio edificio dove si era dimostrata resistente allo shock termico e all'iperclorazione. 1 L dell'acqua campionata è stato filtrato su filtri a membrana in nitrocellulosa Millipore (dimensione dei pori 0,22 µm. Sigma-Aldrich Italy, Milano, Italia), risospeso in 10 ml del campione originale, agitato su vortex per 30 sec, trattato a 50°C per 30 minuti, diluito, messo in piastra su terreno Agar CYE con estratto di lievito e carbone (Becton Dickinson) integrato con supplemento di crescita Legionella BCYE-α e incubato per 10 giorni a 37°C in atmosfera al 2,5% di CO₂. Colonie con morfologia tipica sono state subcoltivate su CYE e BCYE e soltanto colonie non cresciute su CYE sono state prese in considerazione per l'identificazione per mezzo di test di agglutinazione utilizzando sieri specifici (Biolife Italy, Milano, Italia).

M. chelonae è stato isolato dall'acqua del rubinetto di un edificio scolastico dove era stato l'agente eziologico responsabile di infezioni cutanee. L'acqua campionata è stata decontaminata con cloruro cetilpiridinio (0,04%) e filtrata con membrane Millipore (dimensioni dei pori 0,45 µm, Sigma-Aldrich), messa in piastra su Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson) e incubata a 37°C per 6-10 settimane. Colonie tipiche sono state subcoltivate su terreno BBL™ Lowenstein-Jensen (Becton Dickinson) e incubate per 6-10 settimane a 37°C. Le colonie sviluppate sono state sottoposte a colorazione di Ziehl-Neelsen per rilevare microrganismi acidoresistenti (D'Ancona et al., 2014). Quindi, è stata eseguita una PCR (Polymerase Chain Reaction) per confermare la presenza di micobatteri a livello di genere e un'analisi di restrizione per l'identificazione a livello di specie (Briancesco et al., 2010).

Sono state acquistate sospensioni di spore di *B. clausii* (Enterogermina®; Sanofi-Synthelabo OTC, Milano, Italia).



Procedura

Prima di ogni sessione di test, i microorganismi, ad esclusione delle spore, sono stati subcoltivati in terreni e condizioni appropriate. Dopo l'incubazione le colonie sono state raccolte con una spatola e sospese in provette contenenti 10 ml di acqua dura (Hard Water, HW) (19,84 g MgCl₂, 46,24 g CaCl₂ in 1 L di acqua distillata sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti).

Per ciascun ceppo e per ciascun test, la sospensione batterica in HW è stata equamente distribuita in due provette sterili.

Una retina metallica sterile (**Figura 1**) è stata introdotta in ogni provetta per 1 h. Durante questo intervallo di tempo, le reti sono state contaminate dai microrganismi della sospensione batterica. Le provette sono poi state collocate in una sacca per la conservazione a una temperatura di 4°C e trasportate all'ambulatorio odontoiatrico.



Figura 1

Rete metallica da contaminare con la sospensione batterica



Una rete (rete Test) è stata introdotta all'interno della linea idrica di uno strumento pseudo-turbina, appositamente progettato per simulare una contaminazione massiva delle linee idriche del riunito (**Figura 2**). Tale strumento è stato collegato alla linea idrica di un riunito equipaggiato con Bioster, un sistema di disinfezione che effettua cicli di disinfezione dei condotti idrici, collegando questo strumento al posto di una turbina, nel punto più distante dalla erogazione del disinfettante. Il ciclo, in particolare, è stato il seguente: flusso d'aria per scaricare l'acqua dai condotti idrici, flusso di disinfettante (PeroxyAg+ --Cefla Dental Group, contenente H₂O₂ 3% v/v e Ag⁺ 0,001%, contatto di 10 min per la disinfezione,



flusso d'aria per rimuovere il disinfettante, risciacquo con acqua per eliminare residui di disinfettante dall'impianto idrico. Al termine del ciclo la rete è stata asetticamente rimossa dallo strumento e collocata in una provetta contenente 5 mL di HW e sodio tiosolfato (5 g/L), utilizzato per neutralizzare i residui di disinfettante. Questo neutralizzante è stato scelto perché efficace sia contro H₂O₂ sia contro Ag⁺, e per la mancanza di qualsiasi attività antimicrobica (Kemp e Schneidert, 2000). L'altra rete (rete di controllo) è stata introdotta all'interno di un altro strumento pseudo-turbina riempito con acqua dura sterile, dove è rimasta durante tutto il tempo in cui la rete Test era sottoposta al ciclo BioSter, per essere poi trasferita in maniera asettica in un'altra provetta contenente 5 mL di HW e tiosolfato di sodio.



Figura 2

Il connettore della turbina ai condotti idrici del riunito, la rete e lo strumento pseudo-turbina progettato per simulare una contaminazione massiva dei condotti idrici del riunito (a). La rete contaminata è inserita all'interno dello strumento pseudo-turbina (b), che è collegato al connettore della turbina (c) e fissato al sistema idrico del riunito al posto della turbina dentale, nel punto delle linee idriche più distante dalla erogazione del disinfettante.



a



b



Le provette sono state conservate a 4°C e trasportate al laboratorio della Sezione Dentale del Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, dove sono state processate entro 30 min.

Le provette sono state agitate su vortex per 5 min, quindi sono state realizzate diluizioni 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 in provette contenenti HW. Quindi 0,5 mL della sospensione non diluita e di ciascuna diluizione sono stati messi in piastra in duplicato su piastre contenenti i terreni sopra indicati, e incubati come precedentemente descritto. I restanti 4,5 mL di sospensione non diluita sono stati filtrati su membrana in nitrocellulosa Millipore (dimensioni dei pori 0,45 μm , Sigma-Aldrich Italy) e successivamente le membrane sono state messe su piastra e incubate. Per ciascun ceppo è stato utilizzato il terreno selettivo, mentre *B. clausii* è stato messo in piastra su Tryptone Soy Agar (TSA –Becton Dickinson).

Dopo il periodo di incubazione, sono state conteggiate le colonie e stimate le cariche batteriche per le reti di Prova e di Controllo, espresse in UFC. L'utilizzo di terreni selettivi specifici ha garantito il conteggio dei soli microrganismi testati, e l'esclusione di microrganismi potenzialmente presenti nell'acqua. Per quanto



riguarda *B. clausii*, il problema è stato risolto conteggiando esclusivamente le colonie con morfologia tipica.

Per ciascun ceppo il test è stato ripetuto cinque volte.

Analisi statistica

Per ciascun ceppo, le cariche batteriche rilevate con le reti di Controllo sono state considerate come markers del livello di contaminazione delle linee idriche del riunito prima del ciclo Bioster, mentre le cariche rilevate con le reti Test sono state considerate come markers del livello di contaminazione residua dopo l'esecuzione del -ciclo. Pertanto, nel presente testo i livelli di contaminazione sono stati indicati indifferentemente come Controllo o Pre-disinfezione e Test o Post-disinfezione.

Per ciascun ceppo e ciascun test, la Riduzione Relativa ascrivibile al ciclo Bioster è stata valutata con la formula:

$$\text{Riduzione Relativa} = \frac{[(\text{Carica Controllo}) - (\text{Carica Test})]}{(\text{Carica Controllo})} \times 100$$

Per ciascun ceppo, la Riduzione Relativa media è stata valutata con un intervallo di confidenza del 95%.

Le cariche batteriche sono state sottoposte a trasformazione logaritmica per normalizzare le varianze. Zero UFC è stato trattato artificialmente come 1 UFC ottenendo così 0 log UFC quando non erano rilevabili microrganismi. Sono state valutate le differenze tra il logaritmo della Carica Controllo e il logaritmo della Carica Test per stimare la riduzione logaritmica della carica attribuibile al ciclo Bioster. Sono inoltre state valutate le medie dei logaritmi delle cariche per ciascun ceppo.



RISULTATI

Il riunito è stato collegato alla rete idrica municipale e non utilizzato per terapie su pazienti prima delle sessioni di test. Nelle giornate precedenti ciascuna sessione di test, è stato effettuato un ciclo di disinfezione. Prima dell'avviamento dello studio e 24 ore dopo il ciclo di disinfezione, è stato testato il livello di contaminazione dell'acqua del riunito con la conta dei batteri eterotrofi con semina su piastra di campioni idrici e diluizioni 1:10 su BD Bacto Yeast Extract (estratto di lievito) (Becton Dickinson). Una serie di piastre è stata incubata a 22°C e un'altra serie a 36°C per tre giorni seguendo le procedure precedentemente descritte (Castiglia et al., 2008). La carica batterica totale è risultata pari a 42 UFC/mL e 49 UFC/mL rispettivamente a 22°C e 36°C, sufficientemente bassa da non interferire con le procedure di prova. Le caratteristiche fisiche dell'acqua in uscita dai condotti idrici del riunito erano discretamente stabili. In particolare, la temperatura era compresa tra 18 e 22 °C, il cloro residuo era compreso tra 0,08 e 0,25 mg/L, il pH tra 6,7 e 7,2.

Complessivamente, escludendo una lunga serie di test preliminari e pilota, sono state eseguiti 35 Test e 35 Controlli.

I livelli più elevati di contaminazione pre-ciclo sono stati prodotti da *M. chelonae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, mentre i livelli più bassi sono stati prodotti da *C. albicans* e *L. pneumophila* (Tabella 1). I livelli post-ciclo sono risultati nulli in tutte le occasioni per *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*,



mentre permanevano sempre alcuni microrganismi con *M. chelonae* e spore di *B. clausii* e occasionalmente con *L. pneumophila*.

Tabella 1

Livelli di contaminazione più bassi e più elevati dei condotti idrici del riunito (UFC) pre e post-ciclo, e frequenza delle occorrenze in cui il ciclo ha ottenuto la completa eliminazione dei microrganismi

Microorganismo	Pre-ciclo		Post-ciclo		Percentuale Negativo
	Livello più basso	Livello più alto	Livello più basso	Livello più alto	
<i>S. aureus</i>	11,100,000	20,100,000	0	0	100%
<i>E. faecalis</i>	9,300,000	24,300,000	0	0	100%
<i>P. aeruginosa</i>	7,800,000	21,900,000	0	0	100%
<i>C. albicans</i>	564,000	1,470,000	0	0	100%
<i>L. pneumophila</i>	705,000	948,000	0	90	60%
<i>M. chelonae</i>	3,000,000	96,000,000	32	465	0%
<i>B. clausii</i> (spore)	1,380,000	4,320,000	660	32,100	0%



Le Riduzioni Relative medie dei livelli di contaminazione dei condotti idrici dei riuniti attribuibili al ciclo Bioster, illustrate in **Tabella 2**, possono essere a grandi linee suddivise in tre gruppi. In particolare, 100% con nessuna variabilità (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*), quasi il 100% con variabilità limitata (*L. pneumophila* e *M. chelonae*) e meno del 100% con variabilità elevata (spore di *B. clausii*).

Tabella 2

Riduzioni Relative medie - e intervalli di confidenza del 95% - dei livelli di contaminazione dei condotti idrici del riunito attribuibili al sistema Bioster

Microorganismo	Media della Riduzione Relativa di carica	Intervallo di confidenza del 95%
<i>S. aureus</i>	100.000%	100.000%
<i>E. faecalis</i>	100.000%	100.000%
<i>P. aeruginosa</i>	100.000%	100.000%
<i>C. albicans</i>	100.000%	100.000%
<i>L. pneumophila</i>	99.996%	99.992%-100.000%
<i>M. chelonae</i>	99.995%	99.989%-100.000%
<i>B. clausii</i> (spore)	99.632%	99.257%-100.000%

I più elevati livelli di contaminazione logaritmici medi pre-ciclo sono stati rilevati per *M. chelonae*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* (superiori a 7 log UFC), seguiti da spore *B. clausii* (6,5 log UFC) e *C. albicans* e *L. pneumophila* (prossimi a 6 log UFC) (Tabella 3). La riduzione logaritmica media ascrivibile al ciclo Bioster ha superato i 7



log for *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, è risultata prossima a 6 log per *C. albicans*, superiore a 5 log per *L. pneumophila* e *M. chelonae* e prossima a 3 log per spore *B. clausii*.

Tabella 3

Livelli di contaminazione logaritmici medi dei condotti idrici del riunito (log UFC) con intervalli di confidenza del 95% tra parentesi, prima e dopo il ciclo Bioster con i vari ceppi e riduzione logaritmica media attribuibile al sistema

Microorganismo	Livello logaritmico medio pre-ciclo	Livello logaritmico medio post-ciclo	Riduzione logaritmica media
<i>S. aureus</i>	7.160 (7.074-7.246)	0.000 (0.000)	7.160 (7.074-7.246)
<i>E. faecalis</i>	7.238 (7.087-7.389)	0.000 (0.000)	7.238 (7.087-7.389)
<i>P. aeruginosa</i>	7.174 (7.025-7.323)	0.000 (0.000)	7.174 (7.025-7.323)
<i>C. albicans</i>	5.982 (5.827-6.137)	0.000 (0.000)	5.982 (5.827-6.137)
<i>L. pneumophila</i>	5.920 (5.873-5.967)	0.746 (0.000-1.644)	5.174 (4.288-6.060)
<i>M. chelonae</i>	7.354 (6.678-8.030)	2.059 (1.602-2.516)	5.295 (4.172-6.418)
<i>B. clausii</i> (spore)	6.465 (6.296-6.634)	3.597 (2.815-4.379)	2.868 (2.180-3.556)

L'effetto del ciclo Bioster su microrganismi che contaminavano artificialmente i condotti idrici del riunito è visualizzato nelle **Figure 3 e 4**. Queste figure nel loro insieme sono utili per dimostrare la forte attività decontaminante contro *L. pneumophila* e *M. chelonae*, che ha determinato una riduzione della carica superiore a 5-log, che equivale, dopo il ciclo, a cariche inferiori di oltre 100.000 volte alle cariche pre-ciclo (**Figura 3**)



Figura 3

Livelli di contaminazione logaritmici medi dei condotti idrici del riunito (log UFC) valutati prima (pre-ciclo) e dopo (post-ciclo) il ciclo Bioster con i vari ceppi

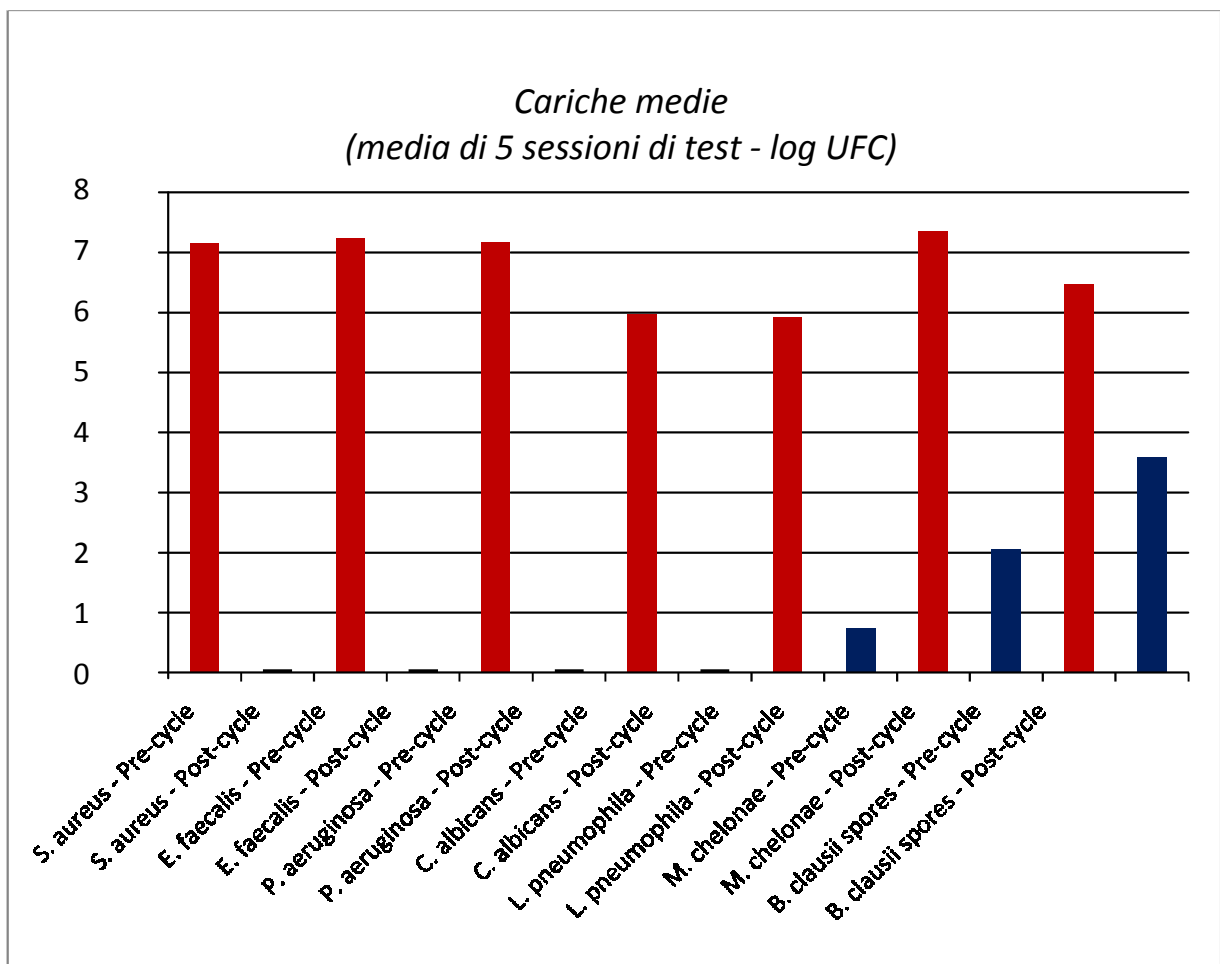
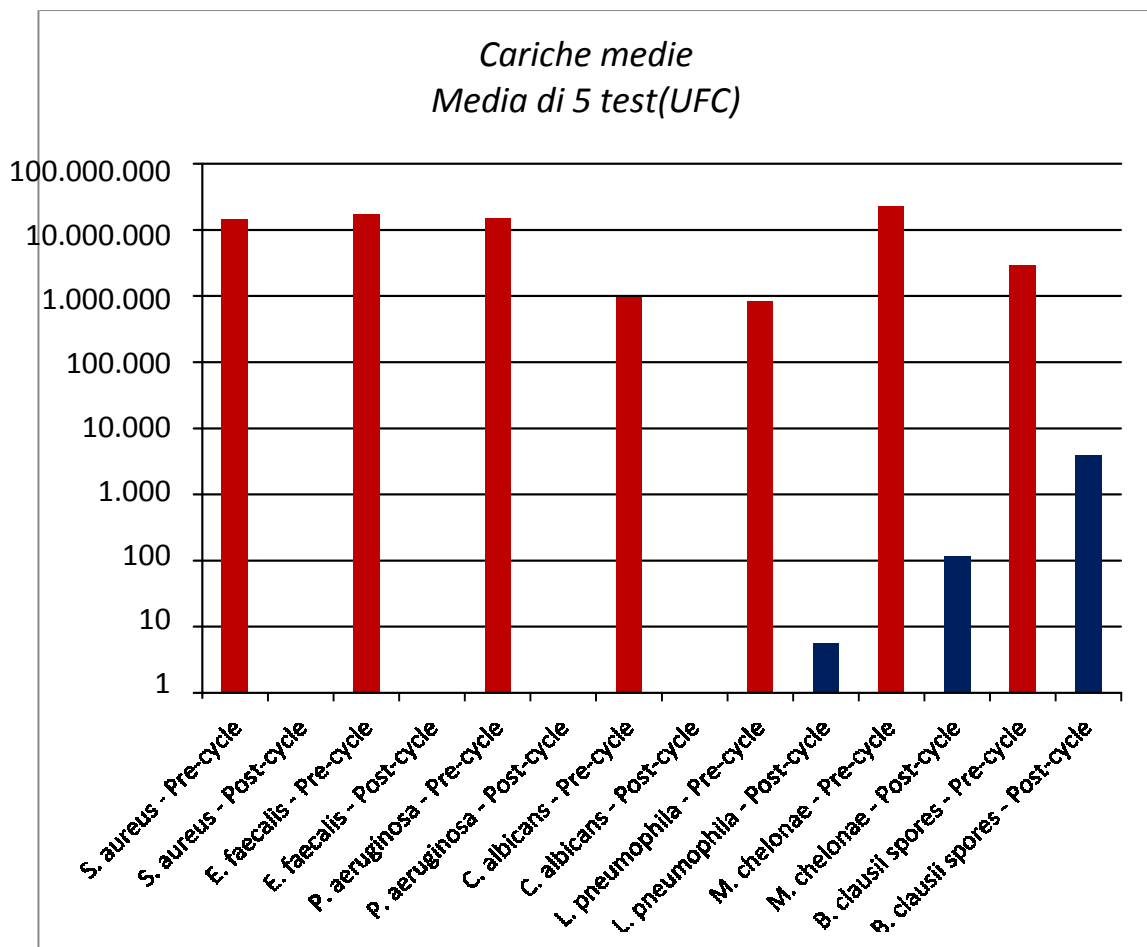




Figura 4

Livelli medi di contaminazione dei condotti idrici del riunito (UFC) valutati prima (pre-ciclo) e dopo (post-ciclo) il ciclo Bioster con i vari ceppi visualizzati su scala logaritmica





In maniera più specifica, i livelli di contaminazione da *L. pneumophila* di 1.000.000 UFC/mL sono stati ridotti a <10 UFC/mL dopo il ciclo di disinfezione, mentre i livelli di contaminazione da *M. chelonae* superiori a 10.000.000 UFC/mL sono stati ridotti a 100 UFC/mL dopo il ciclo di disinfezione (**Figura 4**).

DISCUSSIONE

Attività disinfettante

Non esistono normative Europee per la valutazione dell'efficacia dei sistemi di disinfezione per condotti idrici di riuniti dentali come il sistema Bioster.

Per valutare l'attività antimicrobica del sistema in esame, i dati riportati possono dunque essere confrontati con i requisiti forniti dal Comitato Europeo di Normalizzazione (CEN) per valutare l'attività dei disinfettanti. È importante sottolineare, tuttavia, che questo e altri sistemi di disinfezione non possono essere confrontati con disinfettanti in quanto i primi sono processi che non si basano esclusivamente sull'attività del disinfettante utilizzato. Questa importante differenza implica che un sistema non possa essere testato in condizioni di laboratorio ottimali, ma piuttosto, in contesti reali, cioè in clinica odontoiatrica con tempi di contatto, temperatura, pH e altre condizioni che non possono variare troppo senza logorare gli strumenti o alterare le condizioni e l'ambiente.

Secondo quanto disposto dal CEN, l'attività sporicida (EN 14347:2005) deve essere testata utilizzando spore di *Bacillus subtilis*, subspecie *spizizenii* (American Type Culture Collection –ATCC-6633) e *Bacillus cereus* (ATCC 12826) con cariche di 7



log UFC (limite basale –Nw, pag. 21 delle linee-guida). Si prevede che un disinfettante sporicida riduca tale carica di 4 log entro 30, 60, 90 min. Nel caso in esame, l'uso di spore di una diversa specie e la riduzione logaritmica pari a 2,9 log (**Tabella 3**) suggeriscono che il sistema Bioster non sia comparabile a un disinfettante sporicida. Tuttavia, il fatto che il ciclo sia stato in grado di inattivare oltre il 99% delle spore (**Tabella 2**) in soli 10 minuti suggerisce che il processo presenti un'attività sporicida intermedia e, forse, un'attività sporicida completa se testato per un tempo di contatto di almeno 30 min. Infatti, un'attività sporicida dell'H₂O₂ a 1% è stata riportata fin dal 1940 con tempi di contatto superiori a 5-6 ore (Curran et al., 1940).

Secondo il CEN, l'attività micobattericida (EN 14348:2005) deve essere testata utilizzando *Mycobacterium avium* (ATCC 15769) e *Mycobacterium terrae* (ATCC 15755) con cariche iniziali da 9 log UFC (test in sospensione –N, pag. 12 delle linee guida), mentre l'attività tubercolicida è testata utilizzando esclusivamente *M. terrae*. I disinfettanti devono mostrare una riduzione di almeno 4 log. Benché nel presente studio sia stato testato un solo micobatterio alla carica pre-ciclo di 7 log UFC (**Tabella 3**), il sistema è stato in grado di produrre una riduzione del livello di contaminazione di oltre 5 log, più di dieci volte superiore a quanto richiesto. È pertanto plausibile che l'attività antimicrobica del sistema Bioster sia comparabile a un disinfettante micobattericida e tubercolicida.

Secondo il CEN, l'attività battericida contro legionelle (EN 13623:2010) è testata utilizzando *L. pneumophila* sierogruppo 1 Philadelphia (ATCC 33152) con cariche pari a 7 log UFC (limite basale –N0, pag. 23 delle linee guida). I disinfettanti devono evidenziare una riduzione di almeno 4 log. Pertanto, nonostante nel



presente studio la carica pre-ciclo sia di soli 6 log UFC (**Tabella 3**), non così elevata come indicato in EN 13623:2010, il sistema è stato in grado di produrre una riduzione del livello di contaminazione di oltre 5 log, comparabile a un eccellente disinfettante antilegionella.

I disinfettanti esplicano un'azione fungicida se determinano una riduzione di 4-log di *Aspergillus niger* (ATCC 16404) e *C. albicans* (ATCC 10231) alle cariche iniziali di 6 log UFC (limite basale –N0, pag. 24 delle linee guida) (EN 13624:2003), mentre presentano attività lieviticida se sono attivi soltanto contro *C. albicans*. Poiché non è stato testato *A. niger* non è possibile affermare se il sistema espliciti attività fungicida, tuttavia, con una riduzione di 6-log dei livelli di *C. albicans* (**Tabella 3**), il sistema è comparabile a un eccellente disinfettante lieviticida.

I disinfettanti sono classificati come battericidi se producono una riduzione di 5-log di *S. aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus hirae* (ATCC 10541) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442) alle cariche di 7 log UFC (limite basale –N0, pag. 21 delle linee guida EN 13727:2003). Perciò, benché sia stato utilizzato *E. faecalis* invece di *E. hirae*, il sistema, con una riduzione di 7-log (**Tabella 3**), è confrontabile a un eccellente disinfettante battericida.



Riassumendo, il sistema Bioster è risultato comparabile a un disinfettante con completa

- Attività lieviticida,
- Attività battericida
- Attività battericida contro *L. pneumophila*,
- Attività micobattericida e tubercolocida

e con intermedia

- Attività sporicida

Oltre a questi risultati eccellenti, è importante osservare che i criteri utilizzati nella presente relazione per valutare l'attività antimicrobica del sistema Bioster di disinfezione dei condotti idrici del riunito dentale sono più rigorosi di quelli adottati dal Comitato Scientifico dell'ADA, American Dental Association, per valutare dispositivi per il trattamento delle linee idriche del riunito. Infatti, la tipologia di contaminazione utilizzata dall'ADA era una miscela di *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, isolati di fresco dall'ambiente, a una concentrazione standard di 500 UFC/mL (American Dental Association Council on Scientific Affairs, 2014). Pertanto, il livello riportato di contaminazione post-ciclo da *P. aeruginosa* pari a 0 UFC/mL ottenuto con il sistema Bioster (**Tabella 1**) avrebbe condotto negli Stati Uniti alla certificazione ADA di efficacia.



Efficacia pratica del sistema Bioster nel controllo delle infezioni crociate trasmesse attraverso condotti idrici di riuniti

Le linee guida per il controllo delle infezioni in ambiente odontoiatrico, comprese le più autorevoli tra esse periodicamente pubblicate dal CDC, Centro statunitense per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie, sono necessariamente basate solo in parte sulle evidenze. Infatti, se non sono disponibili dati sul rischio infettivo e l'efficacia delle misure preventive, le linee guida si basano sul cosiddetto Principio di Precauzione, secondo il quale "quando un'attività presenta un potenziale indeterminato di recare danno alla salute umana, dovrebbero essere prese misure di precauzione anche se non vi è evidenza scientifica che tali misure siano necessarie o efficaci". Secondo questa enunciazione, tuttavia, le misure preventive implementate su base precauzionale devono essere periodicamente riviste per valutarne l'efficacia e la tossicità e sostituite con misure basate sull'evidenza. Pertanto, le misure su base precauzionale di controllo delle infezioni crociate in ambiente odontoiatrico devono essere periodicamente valutate per determinarne l'efficacia negli ambienti specifici (Petti e Polimeni, 2010).

L'efficacia e l'attività dei sistemi di disinfezione dei condotti idrici di riuniti devono, perciò, essere testate e certificate sulla base della loro efficacia contro quei microrganismi e ceppi che risultano causa di preoccupazione specifica in contesti odontoiatrici, vista la loro diffusione in detti ambienti e resistenza all'eradicazione sia in ambiente odontoiatrico che tra pazienti odontoiatrici. Secondo tale logica, l'efficacia del sistema Bioster non è stata testata in via teorica utilizzando colture di ceppi di collezione sensibili ad antibiotici e disinfettanti o, nel migliore dei casi, con



incremento adattivo della resistenza ai biocidi controbilanciata da riduzione della resistenza agli antibiotici e viceversa (Joynson et al., 2002). Il sistema è invece stato testato nella pratica utilizzando ceppi isolati di fresco, responsabili di patologie acute resistenti a numerosi antibiotici e disinfettanti, e diffusi nell'ambiente.

Questa logica ha inoltre condotto a testare l'efficacia del sistema Bioster su specie che sono diverse da quelle suggerite dal CEN, ma che rappresentano patogeni importanti in ambienti odontoiatrici. Ad esempio, *E. faecalis* è rilevabile in condotti idrici di riuniti (Petti e Tarsitani, 2006) ed è responsabile del 25-75% dei fallimenti delle cure canalari (Stuart et al., 2006). Pertanto, è probabile che le linee idriche dei riuniti diffondano tali microrganismi nei canali radicolari durante trattamenti endodontici, causando così infezioni endodontiche. Per tale motivo *E. faecalis* è stato preferito a *E. hirae*, la cui patogenicità non è dimostrata. Inoltre, *M. chelonae* è responsabile di infezioni del cavo orale (Pedersen e Raible, 1989) ed è rilevabile in condotti idrici di riuniti (Schulze-Röbbecke et al., 1995), perciò, l'attività antimicrobica esercitata contro *M. chelonae* ha conseguenze più importanti rispetto all'attività esercitata contro *M. avium* e *M. terrae*, che non sono mai stati rilevati in condotti idrici di riuniti.

I presenti dati sono stati utilizzati per valutare l'efficacia del sistema Bioster nell'eradicazione di microrganismi rilevabili nei condotti idrici di riuniti al più elevato livello di contaminazione riportato. I livelli di contaminazione più alti di *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *L. pneumophila*, *M. chelonae* e di spore *B. clausii* riportati in letteratura negli ultimi 25 anni sono stati ricercati utilizzando i database PubMed e Scopus e la chiave di ricerca "dental unit waterline" (condotti idrici di riunito dentale). Se non sono stati trovati dati quantitativi relativi a un ceppo, sono



stati utilizzati dati relativi a specie simili. Per ciascun ceppo, il livello di contaminazione più elevato riportato in letteratura è stato messo a confronto con la riduzione logaritmica della carica da attribuirsi al sistema Bioster. Se la riduzione logaritmica della carica risultava superiore al livello di contaminazione più alto, si è considerato che il sistema Bioster era stato efficace per l'eradicazione di tale ceppo dai condotti idrici del riunito. I risultati sono visualizzabili nella **Tabella 4**.

P. aeruginosa è stata riscontrata di frequente in condotti idrici di riuniti; il livello più alto riportato è pari a 2×10^5 UFC/mL (Barbeau, 2000). Il sistema Bioster ha ridotto i livelli di contaminazione da *P. aeruginosa* di 7 log UFC. L'attività disinfettante è stata dunque sufficientemente potente da eradicare tali microrganismi dai condotti idrici di riuniti.

Sono stati rilevati anche stafilococchi nei condotti idrici di riuniti; il più alto livello di contaminazione riferito era di $1,5 \times 10^4$ UFC/mL (Szymańska e Sitkowska, 2013). Ancora una volta, l'attività disinfettante del sistema Bioster è stata sufficientemente potente da ridurre i livelli di contaminazione da *S. aureus* fino allo zero.

Sono stati rilevati Enterococchi in condotti idrici di riuniti (Petti e Tarsitani, 2006); il più alto livello di contaminazione riferito è stato $1,6 \times 10^3$ UFC/mL (Szymańska e Sitkowska, 2013). In base ai presenti dati, l'attività disinfettante del sistema Bioster è stata sufficientemente potente da impedire la trasmissione di questi microrganismi attraverso i condotti idrici del riunito.

Il microrganismo *Candida* è stato isolato raramente nei condotti idrici di riuniti; il livello più alto rilevabile mai riferito è pari a $6,6 \times 10^1$ UFC/mL (Kadaifciler et



al., 2014), indicativo della capacità di Bioster di neutralizzare tutti i microrganismi *Candida* nei condotti idrici del riunito.

Le Legionelle sono state riscontrate in maniera frequente (Walker et al., 2004) e persistente (Petti et al., 2004) nelle linee idriche di riuniti; il più elevato livello di contaminazione riportato per *L. pneumophila* è di 8×10^3 UFC/mL (Ma'ayeh et al., 2014). Poiché il sistema Bioster ha consentito una riduzione della carica di 5 log, esso è in grado di impedire la trasmissione di *L. pneumophila* sierogruppo 1 attraverso i condotti idrici di riuniti.

I micobatteri sono stati rilevati di frequente nei condotti idrici di riuniti; il più alto livello di contaminazione è stato di $2,1 \times 10^3$ UFC/mL (Schulze-Röbbecke et al., 1995). L'attività disinfettante del sistema Bioster è stata sufficientemente elevata da impedire la trasmissione di tali microrganismi attraverso i condotti idrici di riuniti.

Tabella 4 (visualizzabile nella pagina seguente)

Attività antimicrobica del sistema Bioster (riduzione log UFC) a confronto con i livelli di contaminazione più elevati dei condotti idrici dei riuniti (log UFC/mL) riportati in letteratura. Conseguente efficacia nell'eradicazione di microrganismi in condizioni equiparabili a quelle cliniche (riduzione log UFC meno valori log UFC più elevati)



Micro-organismo	Attività antimicrobica	Micro-organismo	Livello di contaminazione	Efficacia
<i>S. aureus</i>	7.160	<i>Staphylococcus</i> spp.	4.176	SI (<1 UFC residui)
<i>E. faecalis</i>	7.238	<i>E. casseliflavus</i>	3.204	SI (<1 UFC residui)
<i>P. aeruginosa</i>	7.174	<i>P. aeruginosa</i>	5.301	SI (<1 UFC residui)
<i>C. albicans</i>	5.982	<i>C. formata</i>	1.820	SI (<1 UFC residui)
<i>L. pneumophila</i>	5.174	<i>L. pneumophila</i>	3.919	SI (<1 UFC residui)
<i>M. chelonae</i>	5.295	<i>M. chelonae</i> e <i>M. gordonae</i>	3.313	SI (<1 UFC residui)
<i>B. clausii</i> spore	2.868	<i>B. halodurans</i> *	3.059	SI (<1 UFC residui)

**Le spore sono generalmente <10% della carica totale, pertanto è plausibile che la carica di spore sia pari a 2,059

Batteri sporigeni – soltanto un'esigua frazione, prossima al 10%, è costituita da spore - sono stati rilevati in condotti idrici di riuniti al livello più alto di $1,2 \times 10^3$ UFC/mL (Szymańska e Sitkowska, 2013). Poiché il sistema Bioster ha causato una riduzione delle spore pari a 2,9 logaritmi della carica, è plausibile affermare che anche la trasmissione delle spore può essere evitata.

In conclusione, l'attività disinfettante del sistema Bioster è risultata sufficiente a consentire l'eradicazione di tutti i microrganismi testati dai condotti idrici del riunito, anche ai livelli di contaminazione più elevati, risultando così una protezione totale contro la trasmissione di microrganismi nell'ambiente odontoiatrico.



Bibliografia

- Barbeau J. Les films biologiques d'origine hydrique et la dentisterie : la nature changeante du contrôle des infections. *J Can Dent Assoc* 2000;66:539-41.
- Calfee DP. Crisis in hospital-acquired, healthcare-associated infections. *Annu Rev Med* 2012;63:359-71.
- Castiglia P, Liguori G, Montagna MT, et al. Italian multicenter study on infection hazards during dental practice: control of environmental microbial contamination in public dental surgeries. *BMC Public Health* 2008;8:187.
- Curran HR, Evans FR, Leviton A. The sporicidal action of hydrogen peroxide and the use of crystalline catalase to dissipate residual peroxide. *J Bacteriol* 1940;40(3):423-34.
- Depaola LG, Mangan D, Mills SE, et al. A review of the science regarding dental unit waterlines. *J Am Dent Assoc* 2002;133(9):1199–206.
- Joynson JA, Forbes B, Lambert RJ. Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. *J Appl Microbiol* 2002;93(1):96-107.
- Kemp GK, Schneider KR. Validation of thiosulfate for neutralization of acidified sodium chlorite in microbiological testing. *Poult Sci* 2000;79(12):1857-60.
- Ma'ayeh SY, Al-Hiyasat AS, Hindiyeh MY, Khader YS. Legionella pneumophila contamination of a dental unit water line system in a dental teaching centre. *Int J Dent Hyg* 2008;6(1):48-55.
- O'Donnell MJ, Boyle MA, Russell RJ, Coleman DC. Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. *Future Microbiol* 2011;6(10):1209-26.



- Pankhurst CL, Coulter WA. Do contaminated dental unit waterlines pose a risk of infection? *J Dent* 2007;35(9):712-20.
- Pedersen A, Raible J. Intraoral infection with *Mycobacterium chelonae*. A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;67(3),262-5.
- Petti S, Iannazzo S, Tarsitani G. Allogenic succession between *Pseudomonas* and *Legionella* in the water distribution system of a dental hospital. *Ann Microbiol* 2004;54(1):25-30.
- Petti S, Tarsitani G. Detection and quantification of dental unit water line contamination by oral streptococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27(5):504-9.
- Petti S, Polimeni A. The rationale of guidelines for infection control in dentistry: precautionary principle or acceptable risk? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(12):1308-10.
- Petti S, Moroni C, Messano GA, Polimeni A. Detection of oral streptococci in dental unit water lines after therapy with air turbine handpiece: biological fluid retraction more frequent than expected. *Future Microbiol* 2013;8(3):413-21.
- Ricci ML, Fontana S, Pinci F et al. Pneumonia associated with a dental unit waterline. *Lancet* 2012;379(9816):684.
- Schulze-Röbbecke R, Feldmann C, Fischeder R, Janning B, Exner M, Wahl G. Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber Lung Dis* 1995;76(4):318-23.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32(2):93-8.



- Szymańska J, Sitkowska J. Opportunistic bacteria in dental unit waterlines: assessment and characteristics. *Future Microbiol* 2013;8(5):681-9.
- Walker JT, Bradshaw DJ, Finney M et al. Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. *Eur J Oral Sci* 2004;112(5):412-8.
- Walker JT, Marsh PD. Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. *J Dent* 2007;35(9):721-30.

Roma, 16 dicembre 2014

Prof. Stefano Petti