

Schlüsselwörter

Massives metallisches Kupfer
 Antimikrobielle Oberflächen
 Beschichtungsfreie Voll-Metall-Kupferwerkstoffe
 Nosokomiale Infektionen
 VBNC-Stadium
 Krankenhaushygiene
 Trockene Methode

Keywords

Massive metallic copper
 Antimicrobial surfaces
 Free of lamination massive metallic copper materials
 Nosocomial infections
 VBNC-state
 Hospital hygiene
 Contact-killing

***Korrespondierender Autor**

PD Dr. Gregor Grass
 Sanitätsakademie der Bundeswehr
 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
 Neuherbergstr. 11
 80937 München
 E-Mail: gregorgrass@bundeswehr.org

Pauline Bleichert, Hermann Meyer, Gregor Grass*

Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, Neuherbergstr. 11, 80937 München

Inaktivierung von Bakterien und Viren durch metallische Kupferflächen

Inactivation of bacteria and viruses by metallic copper-surfaces

Zusammenfassung

Hintergrund: Nosokomiale Infektionen stellen für die Krankenhaushygiene eine große Herausforderung dar. Durch den Einsatz metallischer Kupferflächen können Bakterien und Viren reduziert und nosokomiale Infektionen verringert werden. In der vorliegenden Studie sollte die antimikrobielle Wirksamkeit von massiven, metallischen Kupferflächen gegenüber Bakterien und Viren untersucht werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob das Kupfer die Entwicklung eines Viable But Non Culturable (VBNC)-Stadiums bei Bakterien induziert oder die Bakterien vollständig inaktiviert.

Methode: Die antimikrobielle Wirksamkeit wurde mit der sog. trockenen Methode („contact-killing“) untersucht. Die Testflächen bestanden aus beschichtungsfreiem reinen Kupfer, als Kontrolle wurde rostfreier Edelstahl verwendet. Als Testorganismen wurden Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* sowie bakterielle und virale Erreger der Risikogruppe 3 (*Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Brucella melitensis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, Vacciniaviren, Affenpockenviren) eingesetzt. Zur Untersuchung einer möglichen VBNC-Induktion wurden MRSA und *E. coli* verwendet.

Ergebnisse: Alle Bakterien und Viren wurden nach dem Kontakt mit der Kupferfläche innerhalb von 5 Minuten um bis zu 7 log₁₀-Stufen inaktiviert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Kupfer *E. coli* und MRSA vollständig inaktivierte.

Schlussfolgerung: Massive metallische Kupferflächen besitzen eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen eine Reihe gramnegativer und grampositiver Bakterien sowie Viren. *E. coli* und MRSA wurden vollständig inaktiviert und konnten keinen VBNC-Zustand mehr einnehmen. Allerdings werden

Kupferflächen etablierte effektive Hygienemaßnahmen, wie chemische Hände- und Oberflächendesinfektion, nicht ersetzen, sondern ausschließlich als ergänzender Baustein in der Infektionsprävention dienen. HygMed 2015; 40 [5]: 192–198

Summary

Background: Nosocomial infections pose a severe challenge for hospital hygiene. Use of metallic copper surfaces free of lamination reduce the numbers of infectious agents on bacteria and viruses and also result in fewer nosocomial infections. In this study the antimicrobial efficacy of massive, metallic copper surfaces was investigated against bacteria and viruses. Further, it was tested if metallic copper induces the viable but not culturable (VBNC) state in bacteria or if the bacteria are inactivated completely.

Method: Antimicrobial efficacy was investigated using the so called dry method (also known as “contact-killing”). Test surfaces were laminate-free, pure copper and as control surfaces stainless steel was employed. Organisms tested included methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli*, as well as bacterial and viral agents of risk group 3 (*Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Brucella melitensis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, vaccinia- and monkeypox-viruses). For investigating possible VBNC induction, MRSA and *E. coli* were used.

Results: All bacteria and viruses upon contact to metallic copper were inactivated up to 7-log units within 5 minutes. Additionally, it was demonstrated that copper completely inactivated *E. coli* and MRSA, respectively.

Conclusion: Massive metallic copper surfaces have antimicrobial efficacy against a variety of gram-negative and -positive bac-

teria as well as viruses. *E. coli* and MRSA were completely inactivated and thus failed to enter the VBNC state. However, copper surfaces will not be able to replace established and effective hygiene measures such as chemical hand and surface disinfection but instead will serve as an additional module aimed at prevention of infections.

Einleitung

In Deutschland erkranken schätzungsweise ca. 400.000 bis 600.000 Menschen pro Jahr an nosokomialen Infektionen [1]. Es ist bekannt, dass auch das unbelebte Umfeld in Krankenhäusern, vor allem häufig berührte Kontaktoberflächen, einen Ursprung vermeidbarer Infektionen darstellt.

Die antimikrobielle Wirkung von Kupfermaterialien wird seit vielen Jahren wissenschaftlich untersucht. Aufgrund dieser Untersuchungen hat im Jahr 2008 die US-Umweltbehörde EPA (Environmental Protection Agency) einzelnen Kupfermaterialien unter bestimmten Voraussetzungen eine antimikrobielle Wirksamkeit bescheinigt [<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloy-products.htm>]. Aktuelle Studien zeigen, dass metallische Kupferflächen in der Lage sind, Keimzahlen um mehrere Dezimalstufen zu reduzieren [2–4]. Eine große klinische Studie an Intensivstationen dreier US-amerikanischer Krankenhäuser zeigte, dass der Einsatz solcher Kupferflächen dazu beitragen konnte, die Infektionsraten mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder Vancomycin-resistenten Enterokokken um ca. 50 % zu verringern – im Vergleich zu den Räumlichkeiten ohne Kupferflächen [4, 5]. Diese positiven Ergebnisse haben in letzter Zeit weltweit zu einem kontinuierlichen Anstieg der Verwendung metallischer Kupferflächen in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen geführt.

Um die antimikrobielle Wirkung von metallischem Kupfer und Kupferlegierungen gegen Mikroorganismen und Viren im Laborversuch zu überprüfen, können zwei verschiedene Methoden angewandt werden: die feuchte und die trockene Methode. Bei der feuchten Methode wird eine Suspension mit einer definierten Zellzahl auf die Kupferfläche getropft und inkubiert [6, 7]. Bei diesem Experiment sind die Erreger nicht im direkten Kontakt mit der zu untersuchenden Fläche, sondern diffundieren frei im Volumen des Mediums. Dies

gilt auch für den japanischen Industriestandard JIS 2801, bei dem die Proben nass auf die Testoberfläche aufgebracht, mit einer sterilen Folie für gewöhnlich 24 Stunden abgedeckt und bei 35 °C inkubiert werden. Das nasse Aufbringen der Testorganismen über längere Zeiträume und in einem Medium, in dem sie sich potenziell vermehren können, spiegelt jedoch kaum die Situation einer typischen Kontamination von häufig berührten Kontaktoberflächen im Krankenhaus wider. Daher ist die feuchte Methode eher mit einer Kontamination wie z. B. mit Blut oder Sputum vergleichbar.

Bei der trockenen Methode, auch als „contact-killing“ bezeichnet, handelt es sich um die Simulation von realen Bedingungen möglicher Anwendungsgebiete von antimikrobiellen Oberflächen, wie z. B. in Krankenhäusern oder Arztpraxen [8, 9]. Hierbei wird eine definierte Anzahl an Erregern in einem kleinen Volumen aufgenommen und auf die gewünschten Oberflächen verstrichen. Die überschüssige Flüssigkeit verdunstet innerhalb weniger Sekunden, so dass die Erreger im direkten Kontakt mit der Oberfläche stehen [8]. Auch bei den möglichen Anwendungsgebieten von metallischem Kupfer und Kupferlegierungen bei Kontaktflächen bleibt nach einer kurzen Berührung ein leichter Schweißfilm auf den Oberflächen zurück, der sofort verdunstet, so dass lediglich die Erreger zurückbleiben. Insgesamt entspricht die trockene Methode also eher der Realität in Gesundheitseinrichtungen.

Die antimikrobielle Wirkung von metallischen Kupferflächen wurde gegen eine Vielzahl von Erregern der Risikogruppe 1, wie z. B. nicht-pathogenen Staphylokokken, *Escherichia coli* und *Enterococcus hirae*, sowohl mit der feuchten als auch der trockenen Methode nachgewiesen [10–13]. Die Wirksamkeit von metallischem Kupfer konnte auch gegen zahlreiche Erreger der Risikogruppe 2 gezeigt werden. Dabei wurden Bakterien, wie z. B. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enterica* untersucht, als auch Viren, wie das Influenza-A-Virus (behülltes Einzelstrang-RNA-Virus), das Norovirus (unbehülltes Einzelstrang-RNA-Virus) und das Herpes-Simplex-Virus (behülltes Doppelstrang-DNA-Virus) [7, 14–18].

Die Inaktivierung von MRSA konnte bislang nur mit der feuchten Methode nachgewiesen werden [19, 20]. Unter die-

sen Bedingungen geschieht dies innerhalb von 45 bis 180 Minuten.

Bisher wurde – mit Ausnahme von *Mycobacterium tuberculosis* – noch nicht überprüft, ob metallische Kupferflächen auch gegen Erreger der Risikogruppe 3 wirksam sind [21]. Solche Erreger verursachen schwere, möglicherweise auch tödlich verlaufende Erkrankungen, bei denen aber eine wirksame Vorbeugung oder Behandlung normalerweise möglich ist; eine weitere Verbreitung der Erreger in der Bevölkerung ist eher unwahrscheinlich, aber möglich. Dem Schutz von Arbeitnehmern, die mit Erregern der Risikogruppe 3 arbeiten, kommt dabei eine große Bedeutung zu. Denn um diese Erreger untersuchen zu können und gleichzeitig die Sicherheit der Mitarbeiter zu garantieren, müssen die Labore über einen ausreichenden Sicherheitsstandard (Biological Safety Level, BSL) verfügen, der der Gefährlichkeit des Krankheitserregers entspricht.

Viele Bakterien können in einen sogenannten lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zustand (Viable But Non Culturable, VBNC) übergehen. In diesem Stadium können die Erreger nicht mehr wachsen und kultiviert werden [22, 23]. Dieser Zustand wird durch Stress induziert, wie z. B. durch Nährstoffmangel, ungünstige Temperaturen, osmotischen Druck, Schwermetalle oder auch ionisches Kupfer [24–28]. Das VBNC-Stadium geht mit der Reduktion der metabolischen Aktivität einher, die allerdings reversibel ist, so dass die Erreger innerhalb kürzester Zeit wieder in ihren voll-infektiösen, metabolisch aktiven Zustand übergehen können. Das VBNC-Stadium ist gut untersucht und kommt bei einer Vielzahl von pathogenen Bakterien aber auch Pilzen vor: *S. aureus*, *Escherichia coli* (z. B. *E. coli* ED8739, EHEC/EAEC O104:H4), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *M. tuberculosis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Saccharomyces cerevisiae* [24, 29, 30–32]. Problematisch bei Bakterien im VBNC-Stadium ist die Tatsache, dass die Erreger zwar nicht mehr auf Laborkultivierungsmedien vermehrungsfähig sind, aber ihre Infektiosität erhalten bleibt. So konnte z. B. in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass *Listeria monocytogenes*, welches in das VBNC-Stadium eingetreten war, dennoch virulent blieb [33].

In der nachfolgenden Studie wurde die Wirksamkeit von metallischen Kupferflächen gegenüber Bakterien und Viren der Risikogruppe 3 untersucht. Dazu wurden

folgende Bakterien ausgewählt: *Yersinia pestis* (Pest), *Burkholderia mallei* (Rotz), *Burkholderia pseudomallei* (Melioidose), *Francisella tularensis* (Tularämie) und *Brucella melitensis* (Brucellose). Die Wirksamkeit gegen Viren der Risikogruppe 3 wurde an Orthopockenviren getestet, wobei der Impfstamm Vaccinia-Virus sowie Affenpockenviren verwendet wurden. Das Vaccinia-Virus wurde während des weltweiten Impfprogramms zur Impfung gegen Variola major (echte Pocken) eingesetzt, da es infolgedessen zu einer Immunität gegenüber echten Pocken kommt [34]. Echte Pocken (Variola major) gelten seit den späten 70er Jahren als ausgerottet [35, 36]. Affenpocken hingegen treten gehäuft in Zentralafrika auf und verursachen ein ähnliches klinisches Bild wie echte Pocken, wobei die Sterblichkeit allerdings geringer ist [37, 38]. Es handelt sich dabei um eine Zoonose, die durch Nager auf den Menschen (und Affen) übertragen werden kann. Vaccinia-Virus sowie Affenpockenviren wurden in der vorliegenden Studie als Modellorganismen für Variola major verwendet.

In die vorliegende Studie wurde auch MRSA mit einbezogen. Das Bakterium gehört zu den Krankenhauskeimern, die häufig nosokomiale Kolonisationen und Infektionen hervorrufen, und steht daher besonders im Fokus der Infektionsprävention. Außerdem wurde die Inaktivierung von MRSA durch Kupfer bislang nur mit der feuchten Methode nachgewiesen [19, 20].

Verschiedene Bakterienspezies können durch „ionischen Kupferstress“ in den VBNC-Zustand übergehen und später aus diesem Stadium wiedererweckt werden. Die vorliegende Studie sollte klären, ob Bakterien auch durch „metallischen Kupferstress“ in ein VBNC-Stadium versetzt werden können oder ob das metallische Kupfer in der Lage ist, die Bakterien vollständig zu inaktivieren. Als Modellorganismen dienten für gramnegative Bakterien *E. coli* und für grampositive Bakterien MRSA.

Materialien und Methoden

Bakterien und Wachstumsbedingungen

E. coli (K-12, W3110, BSL-1-Organismus) und MRSA (N315) wurden unter BSL-2 Bedingungen kultiviert, während die folgenden Bakterien in einem Labor der Schutzstufe 3 angezogen und getestet wurden: *Yersinia pestis* (NCTC 2028), *B. mallei* (NCTC

3709), *B. pseudomallei* (NCTC 08016-03), *B. melitensis* (NCTC 10094) und *F. tularensis* (FSC 237). Alle Bakterien, mit Ausnahme von *F. tularensis*, wurden auf Columbia Blut Agar (5 % Schafblut) (BD, Heidelberg) bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. *F. tularensis* wurde auf Herz-Cystein Agar (BD, Heidelberg) bei 37 °C mit 5 % CO₂ (v/v) für 48 Stunden inkubiert.

Viren und Wachstumsbedingungen

Es wurden verschiedene Orthopockenvirenspezies untersucht. Vaccinia-Virus (Stamm Elstree) wurde unter BSL-2 Bedingungen, Affenpocken-Virus (Stamm Copenhagen) unter BSL-3 Bedingungen kultiviert. Zur Anzucht wurden Nierenzellen der Afrikanischen Meerkatze verwendet (MA 104, FLI, Greifswald), die unter BSL-2 Bedingungen in 75 cm² großen Zellkulturgefäßen (Greiner, Frickenhausen) mit 30 ml Minimal Medium (Minimal Essential Medium, MEM, LifeTechnologies, Darmstadt) und 5 % (v/v) fötalem Kälber-Serum (FKS, LifeTechnologies, Darmstadt) bei 37 °C angezogen wurden. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:10 geteilt. Dafür wurde das Medium entnommen und die Zellen mit 5 ml 0,25 % (v/v) Trypsin-EDTA (LifeTechnologies, Darmstadt) für 5 bis 10 Minuten bei 37 °C gelöst. Durch Zugabe von 15 ml MEM mit 5 % FKS konnte die Wirkung von Trypsin abgestoppt werden.

Zur Infektion wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 95 % angezogen. Anschließend wurde das Wachstumsmedium vollständig entnommen und 1 ml Virus-Suspension und 2 ml MEM auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Alle 20 Minuten wurde die Zellkulturflasche geschwenkt. Anschließend wurden 30 ml MEM mit 3 % FKS (v/v) hinzugegeben und für 3 bis 4 Tage unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Beim Erreichen eines zytopathischen Effektes von 4+ wurde die Infektion abgestoppt. Um die Virus-Partikel zu lösen, wurden die Zellen bei –20 °C dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Die Virus-Suspension wurde in Aliquots zu je 1 ml abgefüllt. 24 Stunden vor Beginn eines Experiments wurden 5 × 10⁴ frische Zellen in 2 ml MEM mit 3 % FKS (v/v) pro Loch einer 6-Loch-Platte (VWR, Darmstadt) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ (v/v) inkubiert.

Vorbehandlung der Metalloberflächen

Es wurden zwei verschiedene massive Metallplättchen mit einer Fläche von je 2,5 ×

2,5 cm benutzt. Als Testflächen wurden Plättchen aus reinem (Vollmetall-)Kupfer (Reinheitsgrad Cu 99,9%, Werkstoffbezeichnung C10000, Wieland-Werke AG, Ulm) verwendet. Als Kontrollplättchen wurde rostfreier Edelstahl (Werkstoffbezeichnung U2A AISI 321, Wieland-Werke AG, Ulm) verwendet. Die Plättchen wurden außerhalb des BSL-3 Bereiches vorbereitet. Hierfür wurden die Kupferplättchen für 30 Sekunden in 3 % (w/v) Natriumhydroxid gewaschen und anschließend mit Aqua dest. gespült und getrocknet. Im zweiten Reinigungsschritt wurden die Plättchen für 30 Sekunden in 10 % (v/v) Schwefelsäure gewaschen, anschließend erneut mit Aqua dest. gespült und getrocknet, um die mögliche Patina zu entfernen. Zur Oberflächen-desinfektion wurden die Kupferplättchen mit Ethanol beschichtet und zum Trocknen in sterile Petrischalen gegeben. Die Kontrollplättchen aus Edelstahl wurden lediglich in Ethanol gewaschen und ebenfalls getrocknet. Anschließend wurden die Plättchen in das BSL-3 Labor transferiert.

Durchführung der trockenen Methode („contact-killing“)

Alle Bakterien wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,2) von den Festmedien abgeschwemmt und zu einer Lebendzellzahl von ca. 5,6 × 10⁸ Zellen pro ml (bestimmt durch Plattierung von Verdünnungsreihen) aufkonzentriert. Aus dieser Suspension wurden 40 µl entnommen, auf ein steriles Wattestäbchen gegeben und drei Mal auf die Metallplättchen ausgestrichen, die zurückgebliebene Flüssigkeit verdampfte innerhalb von Sekunden und es blieben – wie auch Espirito Santo et al. zeigen konnten – ca. 4 bis 5 % der eingesetzten Erreger auf der Oberfläche zurück (Daten nicht gezeigt) [8]. Unterschiede in der Wiederfindung der eingesetzten Zellzahlen sind auf unterschiedlich starkes Anhaften der Erreger an den Fasern der Wattestäbchen zurückzuführen. Nach dem Auftragen wurden die Metallplättchen unterschiedlich lang (t=0; t=30 s; t=1 min; t=5 min; t=7 min oder t=10 min) bei Raumlufttemperatur (21 bis 23 °C) inkubiert. Danach wurden die Plättchen in 50 ml Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml PBS-Medium und ca. 25 Glaskugeln (Ø 2 mm, Carl Roth, Karlsruhe) überführt. Im Anschluss wurden diese für 1 Minute mit einem Vortexschüttler (VWR, Darmstadt) gemischt, die Erreger mit PBS-Medium verdünnt und auf feste Nährmedien – wie unter „Bakterien und Wachstumsbedingungen“

beschrieben – ausplattiert. Die überlebenden Zellen wurden nach 24 (48 bei *F. tularensis*) Stunden Inkubation bei 37 °C als Koloniebildende Einheiten (KBE) ausgezählt.

Zur Durchführung der trockenen Methode mit den Viren wurden die Virussuspensionen aufgetaut und ein Volumen von 40 µl (~10⁶ Plaque-bildende Einheiten, PBE) auf sterile Wattestäbchen gegeben, wie oben beschrieben auf die Metallplättchen ausgestrichen und bei Raumlufttemperatur inkubiert. Die Virussuspensionen wurden verdünnt und in die vorbereiteten 6-Loch Platten zur Infektion von MA 10⁴ Zellen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit (diese richtete sich danach, wie lange es dauerte, bis die Plaques gut zu erkennen waren) von 48 bis 62 Stunden bei 5 % CO₂ (v/v) wurden die infektiösen Viruspartikel als PBE quantifiziert. Hierfür wurde der Mediumüberstand entnommen und die Zellen für 10 Minuten in 3 ml Kristallviolett/10 % Formalin Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung mit Aqua dest. ausgewaschen und die PBE gezählt.

Test auf Induktion des VBNC-Stadiums

Die zu testenden Bakterien sowie die Kupfer- bzw. Edelstahl-Plättchen wurden nach den oben beschriebenen Bedingungen vorbereitet. Nach dem Auftragen von 40 µl (ca. 5,6 × 10⁸ Zellen pro ml) mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens wurden die Metallplättchen für 10 Minuten bei Raumlufttemperatur inkubiert. Die Dauer von 10 Minuten wurde deshalb gewählt, weil für die beiden Testorganismen *E. coli* und MRSA eine Inaktivierungszeit von 1 bzw. 5 Minuten ermittelt worden war. Die Plättchen wurden anschließend in 50 ml Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml PBS-Medium und ca. 25 Glaskugeln (Ø 2 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) überführt und für 1 Minute mit einem Vortexschüttler (VWR, Darmstadt) gemischt. Die Suspension wurde vorsichtig in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen dekantiert und 10 Minuten bei 5.000 Umdrehungen pro Minute (7.000 × g) zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgenommen. Um die gelösten Kupferionen zu binden und dadurch die Zellen aus dem möglichen VBNC-Zustand durch Umkehrung des verursachenden Stresses wiederzubeleben, wurde das Zellsediment mit 1 ml 500 µM Ethylendiamintetraacetat-Lösung (EDTA) gewaschen. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und eine Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Mi-

Tabelle 1: Inaktivierungszeiten verschiedener Bakterien und Orthopockenviren auf metallischen Kupferflächen. Gezeigt sind Durchschnittswerte dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichungen (Cu=Kupferplättchen; ES=Edelstahlplättchen; KBE= Kolonie-bildende Einheiten; PBE=Plaque-bildende Einheiten, t=Zeitraum zwischen dem Aufbringen der Zellen und der Entfernung von den Metallflächen).

| Erreger | Cu t=0 Anzahl KBE bzw. PBE/ml | ES t=0 Anzahl KBE zw. PBE/ml | Cu Zeitraum bis zur Inaktivierung (d. h. Anzahl KBE bzw. PBE/ml=0) | ES KBE bzw. PBE/ ml zum Zeitraum der Inaktivierung auf Cu |
|----------------------------------|--|---------------------------------------|--|---|
| <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 6,3±3,9×10 ⁴ | 2,5±4,1×10 ⁶ | 30 s | 5,0±1,7×10 ⁵ |
| <i>Burkholderia mallei</i> | 2,9±2,8×10 ⁴ | 2,0±1,6×10 ⁶ | 30 s | 5,2±4,8×10 ⁶ |
| <i>Yersinia pestis</i> | 6,1±6,0×10 ⁵ | 8,0±4,4×10 ⁶ | 1 min | 1,2±0,5×10 ⁵ |
| <i>Escherichia coli</i> | 6,0±5,2×10 ⁶ | 2,7±0,4×10 ⁶ | 1 min | 8,5±5,3×10 ⁵ |
| <i>Brucella melitensis</i> | 1,2±1,0×10 ⁷ | 8,4±1,3×10 ⁷ | 3 min | 8,3±7,5×10 ⁶ |
| <i>Francisella tularensis</i> | 1,0±0,9×10 ⁷ | 1,3±0,8×10 ⁷ | 5 min | 2,5±0,7×10 ⁴ |
| MRSA | 1,4±0,1×10 ⁵ | 8,0±2,8×10 ⁶ | 5 min | 9,9±2,5×10 ⁵ |
| Vacciniavirus | 4,7±3,8×10 ² | 4,5±3,6×10 ⁷ | 5 min | 1,6±0,9×10 ⁴ |
| Affenpockenvirus | 5,0±3,7×10 ³ | 3,2±0,7×10 ³ | 5 min | 1,9±1,5×10 ³ |

nute (18.200 × g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde für 21 Tage bei 28 °C inkubiert. Jeden Tag wurde eine Probe von 1 µl entnommen, mit 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt, auf Festmedium – wie unter „Bakterien und Wachstumsbedingungen“ beschrieben – ausplattiert und die wiederbelebten Bakterien als KBE bestimmt.

Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Bakterien und Viren der Risikogruppe 3 als auch MRSA und *E. coli* durch den Kontakt mit metallischem Kupfer inaktiviert werden konnten (Tabelle 1). Die Inaktivierungszeiten betragen zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten. Die schnelle Inaktivierung der Erreger durch Kupfer war bereits dadurch evident, dass Erreger, die auf die Flächen aufgetragen und sofort wieder abgenommen wurden (t=0) bereits deutlich weniger überlebende Zellen als die Kontrollprobe auf Edelstahl aufwiesen. Bei *B. pseudomallei*, *B. mallei* und *Y. pestis* betrug der Unterschied bis zu 2 log₁₀-Stufen. *B. pseudomallei* und *B. mallei* wurden auf metallischem Kupfer innerhalb von 30 Sekunden vollständig inaktiviert, *Y. pestis* und *E. coli* jeweils nach 1 Minute. *B. melitensis* und *F. tularensis* waren

gegenüber metallischem Kupfer weniger empfindlich und waren nach 3 bzw. 5 Minuten nicht mehr nachweisbar. MRSA sowie Vaccinia- und Affenpockenviren wurden auf metallischem Kupfer ebenfalls erst nach 5 Minuten inaktiviert.

Metallisches Kupfer löste weder bei MRSA noch bei *E. coli* keinen VBNC-Zustand aus und war in der Lage, die beiden

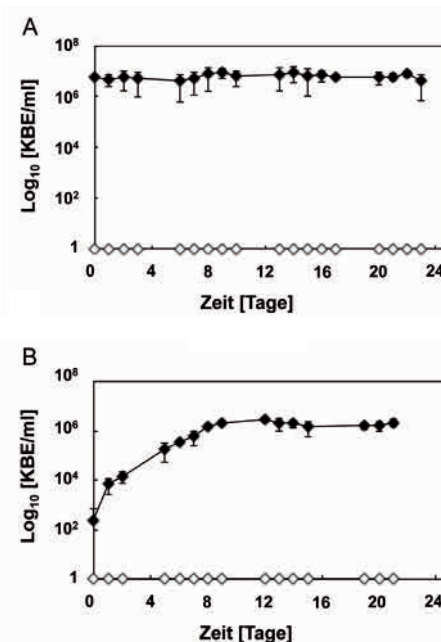


Abbildung 1: Test auf Induktion des VBNC-Stadiums bei *E. coli* (A) und MRSA (B) nach Stress durch metallisches Kupfer (offene Symbole) und Edelstahl (schwarze Symbole).

Spezies vollständig zu inaktivieren (Abbildung 1A und B). Nach erfolgtem „Kupferstress“ zur möglichen Induktion des VBNC-Zustands und anschließender Stressumkehr, konnten selbst nach drei Wochen Inkubationszeit weder *E. coli* noch MRSA wiederbelebt werden. Die Zellzahlen nach dem „Kupferstress“ betrug konstant 0 Zellen/ml. Im Vergleichsexperiment nach Edelstahl-induziertem Stress ohne Induktion des VBNC-Stadiums belief sich die Zellzahl konstant auf ca. 10^7 Zellen/ml für *E. coli* (Abbildung 1A). MRSA benötigte nach „Edelstahl-Stress“ neun Tage, um die Ausgangszellzahl von 10^6 Zellen/ml zu erreichen und diese konstant zu halten (Abbildung 1B).

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Inaktivierungsgeschwindigkeit auf metallischen Kupferflächen in der trockenen Methode generell schneller verläuft als in der feuchten Methode. Viele Erreger benötigten unter Anwendung der feuchten Methode je nach Studie und Organismus zwischen 35 Minuten (MRSA) und 15 Tagen (*M. tuberculosis*) [19, 21]. Alle von uns mit der trockenen Methode untersuchten Bakterien und Viren erlagen innerhalb weniger Sekunden bis Minuten der antimikrobiellen Wirkung der metallischen Kupferfläche. Bei der Auswertung der Ergebnisse, die mit der trockenen Methode erzielt wurden, ist zu beachten, dass die Inaktivierungsgeschwindigkeit zwar reproduzierbar ist, die Anzahl der Erreger aber höheren Schwankungen unterliegt als bei der feuchten Methode [8, 9, 12]. Dass dieser Effekt nicht im Material Kupfer begründet ist, ist daraus zu folgern, dass ähnliche Schwankungsbreiten auch bei der Durchführung mit Edelstahlkontrollflächen erhalten wurden.

Innerhalb der untersuchten Bakterien zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Zellmorphologie und der Inaktivierungsgeschwindigkeit: Stäbchenförmige Bakterien, wie *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *Y. pestis* und *E. coli*, wurden schneller inaktiviert als die kugelförmigen Bakterien *B. melitensis*, *F. tularensis* und MRSA. Die schnellen Inaktivierungs-Kinetiken für *E. coli* entsprechen denen, die zuvor auch in anderen Laboratorien bestimmt wurden [8, 9, 12]. Unsere Ergebnisse lassen sich durch die Art des Aufbringens erklären, die einer Kontamination durch Berührung entspricht: Bei

der trockenen Methode werden die Erreger direkt mit der Oberfläche in Kontakt gebracht. Bedeutsam für das Gesamtverständnis scheint dabei das Oberfläche-zu-Volumenverhältnis der Zielorganismen zu sein. Stäbchenförmige Bakterien haben gegenüber kugelförmigen Bakterien eine größere Kontaktfläche zur Kupferoberfläche, so dass mehr Kupferionen mit der Zelle in Wechselwirkung treten und wirken können. Kokkoide Bakterien haben dagegen eine kleinere Angriffsfläche, der Kontakt zu Kupferionen ist geringer, wodurch sie länger auf der Oberfläche überleben können – aber auch sie unterliegen nach wenigen Minuten dem antimikrobiellen Effekt des Kupfers [9, 10, 19, 39–41].

Es gibt nur wenige Studien zu der Fragestellung, ob metallisches Kupfer in der Lage ist, Viren ebenso wirksam zu inaktivieren wie dies bei Bakterien und Pilzen der Fall ist [16–18]. Alle Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung von Kupferflächen auf Viren wurden bislang mit der feuchten Methode durchgeführt. Nur bei Noroviren kam die trockene Methode zur Anwendung. Hierbei wurde das unbehüllte Einzelstrang-RNA-Virus innerhalb von 5 Minuten inaktiviert [17]. Unsere Untersuchungen zeigen erstmals, dass mit der trockenen Methode auch behüllte DNA-Viren, wie Vaccinia-Viren und Affenpockenviren, innerhalb von 5 Minuten inaktiviert werden konnten. Beide Viren fungieren hier als Modellorganismen für die hochgefährlichen echten Pocken Variola major.

Aus Studien ist bekannt, dass eine Vielzahl von Bakterien bei Stress in ein VBNC-Stadium übergehen und aus diesem wieder in einen metabolisch aktiven Zustand eintreten können [22, 23, 25–27, 29, 30]. Werden Bakterien durch metallische Kupferflächen wie z. B. Türklinken gestresst, stellt sich die Frage, ob diese ebenfalls in einen VBNC-Zustand übergehen können. In früheren Publikationen konnten durch ionischen Kupferstress bis zu 90 % der getesteten Bakterienzellen innerhalb einer Flüssigkultur inaktiviert werden, jedoch traten die übrigen 10 % in den VBNC-Status über und konnten nach 7 bis 25 Tagen wieder aus diesem Zustand austreten [24, 30]. Unsere Studie konnte zeigen, dass metallischer Kupferstress weder bei MRSA noch bei *E. coli* einen VBNC-Zustand auslöste; selbst nach mehreren Wochen konnte kein Wachstum von KBE beobachtet werden. Somit kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Zellen

definitiv tot waren. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch einen noch unbekanntem Auslöser eventuell doch vorhandene VBNC-Zellen in einen kultivierbaren Zustand übergehen könnten.

Oft wird übersehen, dass auch bei oxidierten Kupferflächen die antimikrobiellen Eigenschaften erhalten bleiben. Dies resultiert aus ebenfalls aktiven Kupferoxiden, wie kürzlich gezeigt werden konnte [42]. Es ist davon auszugehen, dass auch metallische Kupferoberflächen wahrscheinlich eine anhaltende inhibierende Wirkung auf Mikroorganismen entfalten können.

In Laborstudien wird meist mit reinen Kupferoberflächen gearbeitet, da sie sich zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit besonders gut eignen. Jedoch kommt es durch die Benutzung zu Verfärbungen, die auch in unseren Untersuchungen im Sinne der Reproduzierbarkeit durch eine Vorbehandlung entfernt wurden. Aufgrund des optisch „unsauberen“ Eindrucks, der Haltbarkeit und Ästhetik kann dieses Material nicht in Krankenhäusern bzw. hygienisch sensiblen Bereichen eingesetzt werden. In diesem Umfeld kommen daher verschiedene Kupferlegierungen (z.B. CuZn21Si3 oder CuZn23Al3Co) zum Einsatz, die einen Mindestgehalt von 60 % Kupfer aufweisen [3]. Bezüglich der anwendungsorientierten Nutzung, ist weiterer Forschungsbedarf nötig, um zweckentsprechende Kupferlegierungen zu entwickeln, die neben einer nachhaltigen antimikrobiellen Wirksamkeit und Haltbarkeit auch ästhetische Kriterien erfüllen.

Die zurzeit in Testung befindlichen Kupferflächen haben auch Limitationen: Endosporenbildende Bakterien wie *Clostridium difficile* benötigen eine wesentlich längere Inaktivierungszeit [40]. Auch die humanpathogenen Pilze *Candida albicans* (bildet Chlamydosporen) und *Aspergillus niger* (bildet Konidien) werden erst nach längerem Kontakt mit Kupfer inaktiviert [43]. Durch die Sporen werden die Organismen nicht nur widerstandsfähiger gegenüber Umwelteinflüssen, sondern scheinen auch metallischem Kupfer und seinen Legierungen zu widerstehen. So konnten Wheeldon et al. zeigen, dass vegetative Zellen von *C. difficile* innerhalb von 30 Minuten abgetötet werden. *C. difficile*-Sporen konnten nach 3 Stunden inaktiviert werden, wenn sie chemisch (Natriumtaurocholat) zum Auskeimen gebracht wurden [44]. Weitere Studien sind nötig, um diese offenen Fragen zu klären.

Metallische Kupferflächen konnten sowohl in experimentellen Laborstudien als auch in klinischen Versuchsreihen die mikrobielle Belastung von Oberflächen reduzieren [2–4]. Ferner konnte in einer multizentrischen klinischen Studie gezeigt werden, dass sich die Verringerung der Erregerlast um 83 % auch in einer um 58 % verminderten Inzidenz von Krankenhausinfektionen auf Intensivstationen widerspiegelte [4, 5]. Es sollten weitere vergleichbare Studien folgen, um diese Beobachtungen zu stützen und die Eigenschaft metallischer Kupferflächen auch in anderen medizinischen Bereichen zu testen. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Kupferflächen etablierte effektive Hygienemaßnahmen, wie chemische Hände- und Oberflächendesinfektion nicht ersetzen, sondern ausschließlich als ergänzender Baustein in der Infektionsprävention dienen können.

Danksagung

Die Autoren danken PD Dr. Holger Scholz (InstMikroBioBw, München), PD Dr. Wolf Splettstößer (InstMikroBioBw, München) und Dr. Birgit Strommenger (RKI, Wernigerode) für die Bereitstellung der untersuchten Bakterienstämme. Ein herzliches Dankeschön richten die Autoren an Daniela Horenkamp und Jutta Brohl für ihre ausgezeichnete technische Assistenz im BSL-3 Laboratorium. Ein weiterer Dank geht an Nina Passoth für die Betreuung und Überarbeitung des Manuskripts. Diese Arbeit wurde unterstützt durch die International Copper Association (New York, U.S.A.) und das Deutsche Kupferinstitut Berufsverband e.V. (Düsseldorf).

Interessenkonflikt

Die Studien zu antimikrobiellem Kupfer in der Arbeitsgruppe Grass wurden durch Drittmittelprojekte der International Copper Association/Copper Development Association/dem Deutschen Kupferinstitut e. V. gefördert.

Literatur

- Gastmeier P, Brunkhorst F, Schrappe M, Kern W, Geffers C. Wie viele nosokomiale Infektionen sind vermeidbar? [How many nosocomial infections are avoidable?]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2010;135:91–3.
- Casey AL, Adams D, Karpanen TJ et al. Role of copper in reducing hospital environment contamination. *J Hosp Infect.* 2010;74:72–7.
- Mikolay A, Huggett S, Tikana L et al. Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;87:1875–9.
- Schmidt MG, Attaway HH, Sharpe PA et al. Sustained reduction of microbial burden on common hospital surfaces through introduction of copper. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2217–23.
- Salgado CD, Sepkowitz KA, John JF et al. Copper surfaces reduce the rate of healthcare-acquired infections in the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34:479–86.
- McLean RJ, Hussain AA, Sayer M et al. Antibacterial activity of multilayer silver-copper surface films on catheter material. *Can J Microbiol.* 1993;39:895–9.
- Weaver L, Noyce JO, Michels HT, Keevil CW. Potential action of copper surfaces on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 2010;109(6):2200–5.
- Espirito Santo C, Taudte N, Nies DH, Grass G. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:977–86.
- Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:1541–7.
- Espirito Santo C, Quaranta D, Grass G. Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. *Microbiologyopen.* 2012;1:46–52.
- Quaranta D, Krans T, Espirito Santo C et al. Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:416–26.
- Espirito Santo C, Lam EW, Elowsky CG et al. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:794–802.
- Fard RM, Heuzenroeder MW, Barton MD. Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. *Vet Microbiol.* 2011;148:276–82.
- Elguindi J, Wagner J, Rensing C. Genes involved in copper resistance influence survival of *Pseudomonas aeruginosa* on copper surfaces. *J Appl Microbiol.* 2009;106(5):1448–55.
- Faundez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 2004;4:19.
- Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:2748–50.
- Warnes SL, Keevil CW. Inactivation of norovirus on dry copper alloy surfaces. *PLoS One.* 2013;8(9):e75017.
- Sagripani JL, Routson LB, Bonifacio AC, Lytle CD. Mechanism of copper-mediated inactivation of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Apr;41(4):812–7.
- Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect.* 2006;63:289–97.
- Michels HT, Noyce JO, Keevil CW. Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Lett Appl Microbiol.* 2009;49:191–5.
- Mehtar S, Wiid I, Todorov SD. The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. *J Hosp Infect.* 2008;68:45–51.
- Xu HS, Roberts N, Singleton FL et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol.* 1982;8:313–23.
- Oliver JD. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;133:203–8.
- Grey B, Steck TR. Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:5325–7.
- Ghezzi JI, Steck TR. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris pv. campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 1999;30:203–208.
- Cook KL, Bolster CH. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *J Appl Microbiol.* 2007;103:573–83.
- Besnard V, Federighi M, Declercq E, Jugiau F, Cappelier JM. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet Res.* 2002;33:359–70.
- Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y et al. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res Microbiol.* 2008;159:709–17.
- Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34:415–25.
- Alexander E, Pham D, Steck TR. The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:3754–6.
- Aurass P, Prager R, Fliieger A. EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environ Microbiol.* 2011;13:3139–48.
- Salma M, Rousseaux S, Sequeira-Le Grand A, Divol B, Alexandre H. Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 2013;8(10):e77600.
- Cappelier JM, Besnard V, Roche SM, Velge P, Federighi M. Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Vet Res.* 2007;38:573–83.

34. Kempe CH. Smallpox vaccination of eczema patients with attenuated live vaccinia virus. *Yale J Biol Med.* 1968;41:1–12.
35. Henderson DA. Smallpox: clinical and epidemiologic features. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:537–9.
36. Henderson DA, Inglesby TV, Bartlett JG et al. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA.* 1999;281:2127–37.
37. Huhn GD, Bauer AM, Yorita K et al. Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1742–51.
38. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140:229–36.
39. Warnes SL, Green SM, Michels HT, Keevil CW. Biocidal efficacy of copper alloys against pathogenic enterococci involves degradation of genomic and plasmid DNAs. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:5390–401.
40. Weaver L, Michels HT, Keevil CW. Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene. *J Hosp Infect.* 2008;68:145–51.
41. Hong R, Kang TY, Michels CA, Gadura N. Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Mar;78(6):1776–84.
42. Hans M, Erbe A, Mathews S et al. Role of copper oxides in contact killing of bacteria. *Langmuir.* 2013;29:16160–6.
43. Weaver L, Michels HT, Keevil CW. Potential for preventing spread of fungi in air-conditioning systems constructed using copper instead of aluminium. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50:18–23.
44. Wheeldon LJ, Worthington T, Lambert PA et al. Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile*: the germination theory. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:522–5.