

# Antimikrobielle Oberflächenbeschichtung tötet multiresistente Krankheitserreger

## Selbst regenerierende, mikrogalvanische Zellen produzieren reaktive Sauerstoffspezies

Ines Probst<sup>1,2</sup>, Ankita Vaishampayan<sup>3</sup>, Vanessa Küchler<sup>3</sup>, Elisabeth Grohmann<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Medizinische Klinik II, Infektiologie, Universitätsklinikum Freiburg

<sup>2</sup>Fakultät für Biologie II, Mikrobiologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

<sup>3</sup>Life Sciences and Technology, Mikrobiologie, Beuth Hochschule für Technik Berlin

Raumfahrzeuge und die Internationale Raumstation (ISS) sind geschlossene Habitate, in welchen die Mikroorganismen, die primär von der Mannschaft stammen, speziellen Umweltbedingungen ausgesetzt sind, die unter anderem durch fehlende Konkurrenz durch Umweltbakterien charakterisiert sind. Dadurch können harmlose kommensale Mikroorganismen überhandnehmen, Oberflächen besiedeln, sogenannte Biofilme ausbilden und somit eine große Gefahr für die Mannschaft darstellen.

Deshalb sind effektive Strategien zur Vermeidung der Besiedlung von Oberflächen sowie eine ständige Kontaminationskontrolle in Raumfahrzeugen von großer Bedeutung, um einerseits mikrobielle Infektionen der Mannschaft und andererseits Korrosion von Materialien durch mikrobiellen Bewuchs/Belag und damit Ausfall von technischen Geräten zu verhindern.

### Desinfektion mit Silber

Silber wurde schon in der Antike als Mittel zur Entkeimung von Trinkwasser eingesetzt und galt als wichtigstes Desinfektionsmittel in der Medizin bis zum ersten Einsatz von Antibiotika in den 1940 Jahren [1].

Aufgrund der stetig steigenden Anzahl von multiresistenten Krankheitserregern wird Silber wieder immer häufiger als Desinfektionsmittel, im Besonderen zur Beschichtung von Oberflächen im klinischen Bereich und allgemein zur Verhinderung von mikrobieller Besiedlung, eingesetzt [2].

Silber wirkt primär in Form von Silberionen, die in wässriger Umgebung von den mit Silber beschichteten Oberflächen freigesetzt werden. Der vermehrte Einsatz von Silberionen ist wegen ihrer Toxizität sowohl für eukaryontische Zellen als auch für die Umwelt bedenklich, zusätzlich haben viele Krankheitserreger bereits Silberresistenzen entwickelt [1, 3].

Durch den dramatischen Anstieg an multiresistenten Krankheitserregern wird der Bedarf an neuen Agenzien zur Vermeidung von mikrobiellen Infektionen immer größer. Eine Möglichkeit stellen mit Silber beschichtete Oberflächen oder Silbernanopartikel dar. Viele Mikroorganismen sind aber bereits silberresistent und die Zytotoxizität von Nanopartikeln erschwert deren Einsatz in der Medizin. Eine Alternative stellt die aus Silber und Ruthenium bestehende, mit einem Vitaminderivat konditionierte Oberflächenbeschichtung AGXX® dar, die durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies Mikroorganismen effektiv abtötet. Resistenzen dagegen sind nicht beobachtet worden. Wir konnten zeigen, dass diese Beschichtung multiresistente Krankheitserreger wie MRSA, methicillinresistente Staphylococcus aureus, abtötet und dessen Biofilmbildung stark reduziert beziehungsweise verhindert. Auf Basis von quantitativen Reverse-Transkription-PCR-Daten (RT-qPCR-Daten) postulieren wir einen Reaktionsmechanismus für die Inhibition des Biofilmwachstums.

### Hoher Bedarf an nicht zytotoxischen Oberflächenbeschichtungen

Aus diesen Gründen ist ein stark steigender Bedarf an nicht zytotoxischen, antimikrobiellen Substanzen, die sich als Oberflächenbeschichtung eignen, zu verzeichnen.

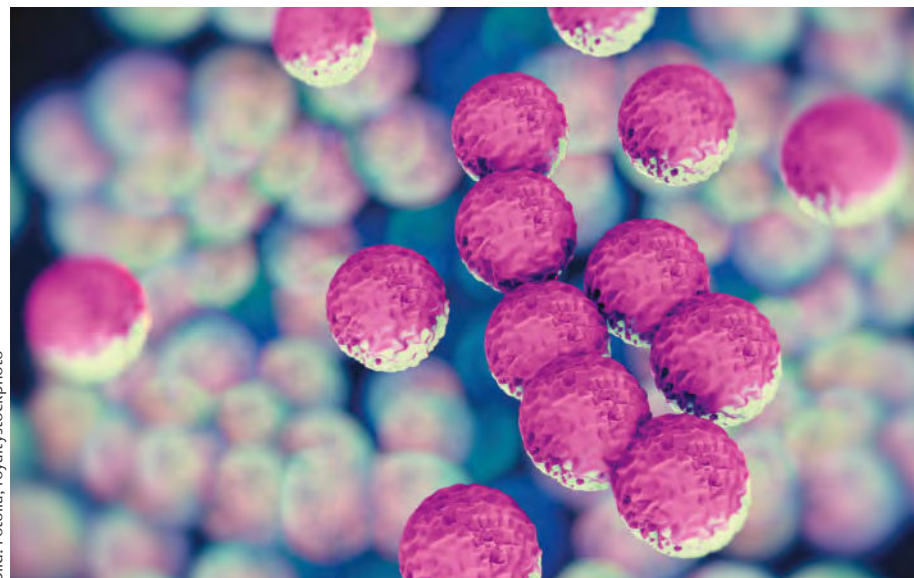
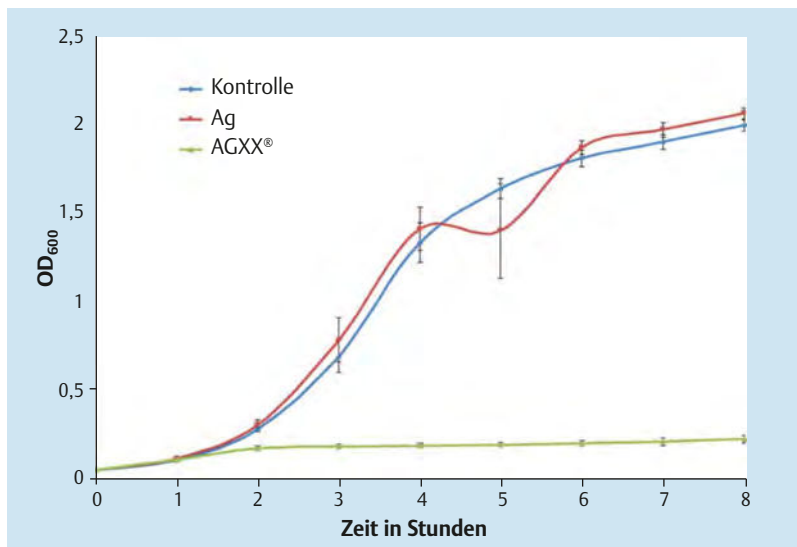


Bild: Fotolia; royaltystockphoto

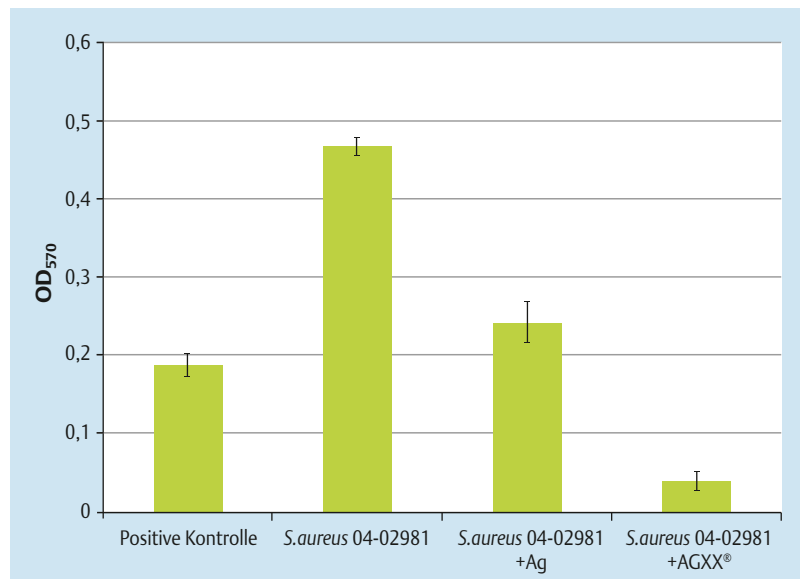


**Abb. 1** Das Wachstum der MRSA-Kulturen wurde als optische Dichte bei 600nm ( $OD_{600}$ ) stündlich 8 Stunden lang gemessen. Die Werte der optischen Dichte,  $OD_{600}$ , sind gegen die Zeit in Stunden aufgetragen.

Die blaue Kurve zeigt die  $OD_{600}$ -Werte für die MRSA-Kultur ohne Zusatz von antimikrobiellem Material. Die braune Kurve stellt die  $OD_{600}$ -Werte für die Kultur mit Silberblech dar. Die grüne Kurve zeigt die Wachstumsinhibition der MRSA-Kultur durch AGXX.

Für beide Kulturen mit Silberblech und mit AGXX wurde dasselbe Verhältnis von Oberflächen (antimikrobielles Material) zu Volumen (Kulturmedium) eingesetzt.

Quelle: Prof. Dr. Elisabeth Grohmann, Berlin



**Abb. 2** Zur Analyse der Biofilmbildung des MRSA-Stammes wurde ein Biofilm-Screening-Assay in TSB-Medium ohne Zusatz von antimikrobiellem Material beziehungsweise mit Zusatz von Silberblech oder AGXX durchgeführt. Die Biofilmbildung wurde als optische Dichte bei 570 nm,  $OD_{570}$ , vermessen. Als positive Kontrolle wurde *E. faecalis* 12030, ein klinisches Isolat, dessen Biofilmbildung bekannt ist, eingesetzt, als negative Kontrolle nicht beimpftes TSB-Medium. Der Wert für die negative Kontrolle wurde von den Messwerten der Proben abgezogen.

Nach [13] ist eine  $OD_{570} < 0,1$  mit Fehlen von Biofilmbildung gleichzusetzen. Eine  $OD_{570}$  zwischen 0,1 und 0,2 bedeutet schwache Biofilmbildung. Eine  $OD_{570} > 0,2$  bedeutet starke Biofilmbildung. Der MRSA-Stamm zeigt eine deutlich stärkere Biofilmbildung als die positive Kontrolle. Die  $OD_{570}$  wird durch Zusatz von AGXX beinahe auf 0 reduziert.

Für beide Kulturen mit Silberblech und mit AGXX wurde dasselbe Verhältnis von Oberflächen (antimikrobielles Material) zu Volumen (Kulturmedium) eingesetzt.

Quelle: Prof. Dr. Elisabeth Grohmann, Berlin

Eine solche Substanz ist AGXX, sie besteht aus mikrogalvanischen Zellen der beiden Edelmetalle Silber und Ruthenium. Die Wirkung von dieser Beschichtung beruht nicht primär auf den freigesetzten Silberionen, obwohl geringe Konzentrationen von Silberionen detektiert wurden [4], sondern auf der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, den sogenannten ROS. Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale, die zu den ROS gehören, konnten an AGXX-Oberflächen bereits nachgewiesen werden [5].

### Vorteile der selbst regenerierenden Beschichtung

Wir haben kürzlich einen Reaktionsmechanismus für AGXX postuliert, der auf 2 miteinander verbundenen Redoxzyklen von Silber und Ruthenium beruht, die zur Selbstregeneration der antimikrobiellen Substanz führen [6]. Ein weiterer Vorteil ist, dass es nur leicht zytotoxisch ist und deswegen als Medizinprodukt eingestuft wurde [7].

Wir konnten zeigen, dass AGXX viele verschiedene Gram-negative und Gram-positive Krankheitserreger, wie EHEC (enterohämorrhagische *Escherichia coli*), *Legionella* und multiresistente *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* und *Staphylococcus epidermidis* Stämme abtötet [4, 8].

In dieser Arbeit zeigen wir, dass diese Beschichtung auch einen methicillinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stamm (MRSA-Stamm) abtötet und dessen Biofilmbildung verhindert. Außerdem konnten wir anhand von molekularen Analysen zeigen, dass sie die Genexpression eines wichtigen Virulenzregulators von MRSA, des *agrC* Gens, „accessory gene regulator protein C“ [9, 10] verhindert, welches für die Biofilmbildung von *S. aureus* verantwortlich ist.

### Selbst regenerierende Beschichtung tötet multiresistente MRSA

In vorangegangenen Arbeiten [4, 8] konnten wir zeigen, dass AGXX multiresistente klinische Stämme von *E. faecalis*, *E. faecium* und *S. epidermidis* nicht nur am Wachstum hindert, sondern effizient abtötet.

In dieser Arbeit präsentieren wir, dass die Beschichtung auch den MRSA-Stamm, *S. aureus* 04-02981, ein klinisches Isolat mit starker Biofilmbildung [11] abtötet (Abb. 1). Wir haben das Wachstum des MRSA-Stammes in TSB-Medium (Tryptic Soy Broth) mit dem Wachstum in TSB-Medium mit Zusatz von AGXX (in Form eines mit Ruthenium beschichteten Silberblechs [4]) sowie in TSB-Medium mit nicht beschichtetem Silberblech verglichen.

In Abbildung 1 wird die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) der 3 Kulturen über einen Zeitraum von 8 Stunden verglichen. Es ist deutlich zu sehen, dass die

OD<sub>600</sub>-Werte der Kultur ohne Zusatz von antimikrobiellen Substanzen sowie der Kultur mit dem Silberblech nach 8 Stunden einen Wert von 2,0 erreichen, während die MRSA-Kultur mit AGXX eine maximale OD<sub>600</sub> von 0,23 nicht überschreitet, was der lag-Phase der Kultur entspricht.

Diese Daten zeigen deutlich, dass diese Beschichtung das multiresistente klinische MRSA-Isolat (außer Methicillinresistenz, Vancomycin und Cephalosporinresistenz) effizient abtötet, während das Silberblech gleicher Dicke praktisch keinen antimikrobiellen Effekt zeigt.

### Keine Biofilmbildung von MRSA

Mit dem Ziel den Einfluss von AGXX auf die Biofilmbildung des MRSA-Stammes, *S. aureus* 04-02981, zu untersuchen, haben wir einen Biofilm-Screening-Assay nach [12] durchgeführt (Abb. 2).

Wir haben die Biofilmbildungsfähigkeit des MRSA-Stammes in TSB-Medium mit der Biofilmbildung in Gegenwart des Silberblechs sowie mit der Biofilmbildung in Gegenwart von AGXX verglichen. Die OD<sub>570</sub>-Werte zeigen deutlich, dass der MRSA-Stamm ohne Zusatz von antimikrobiellen Substanzen einen dichten Biofilm ausbildet (OD<sub>570</sub> = 0,468 ± 0,012), der Zusatz des Silberblechs bewirkt eine Reduktion des Biofilms auf circa 52% (0,242 ± 0,026), während AGXX die Biofilmbildung des Stammes vollständig verhindert (OD<sub>570</sub> = 0,040 ± 0,013) (Abb. 2).

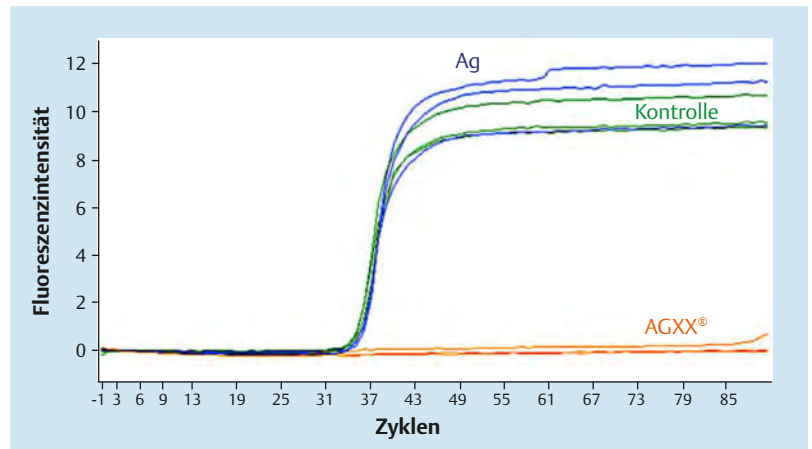
### Keine Bildung von Virulenzfaktoren von MRSA

Um zu sehen, ob AGXX bereits auf Ebene der Transkription einen Einfluss auf die Biofilmbildung von MRSA ausübt, haben wir aus MRSA-Kulturen in TSB-Medium nach Wachstum für gleiche Zeitdauer ohne Zusatz von antimikrobiellen Substanzen beziehungsweise mit Zusatz von Silberblech oder AGXX-RNA isoliert und diese nach Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) einer quantitativen Reverse-Transkription-PCR (RT qPCR) für Virulenzfaktoren von MRSA unterzogen.

Abbildung 3 zeigt die RT-qPCR-Daten für das Gen *agrC* (accessory gene regulator protein C), das die Virulenz in MRSA reguliert. Das Protein AgrC ist Teil eines Quorum-Sensing-Systems, das die Produktion von extrazellulären Proteinen reguliert, vor allem der Proteine Eap und Emp, die für die Biofilmbildung von *S. aureus* wichtig sind [9].

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Silberblech die Expression von *agrC* nicht beeinflusst, da annähernd die gleiche Anzahl von PCR-Zyklen von 34,80 ± 0,56 für die Kultur ohne antimikrobielle Substanz im Vergleich zu 35,04 ± 0,77 Zyklen für die Kultur mit dem Silberblech für die Amplifikation von *agrC* benötigt wird.

In der Kultur mit AGXX wird das *agrC*-Gen auch nach 90 Zyklen nicht amplifiziert (Abb. 3).



**Abb. 3** Die Expression des Virulenzfaktors *agrC* in einer MRSA-Kultur in TSB-Medium ohne Zusatz von antimikrobiellem Material wurde mit der *agrC*-Expression einer MRSA-Kultur mit Silberblech beziehungsweise mit AGXX verglichen. Die Anzahl der RT-qPCR-Zyklen, die zur Amplifikation von *agrC* benötigt wird, wurde für die 3 Kulturen verglichen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Virulenzfaktor *agrC* in der MRSA-Kultur mit AGXX auch nach 90 PCR-Zyklen, einer extrem langen Zeit für einen qPCR-Ansatz, nicht amplifiziert wurde. Das vollständige Fehlen der Expression von *agrC* beweist, dass diese Beschichtung die Produktion des Virulenzfaktors effektiv verhindert.

Für beide Kulturen mit Silberblech und mit AGXX wurde dasselbe Verhältnis von Oberflächen (antimikrobielles Material) zu Volumen (Kulturmedium) eingesetzt.

Quelle: Prof. Dr. Elisabeth Grohmann, Berlin

Das Ergebnis der RT-qPCR-Studie zeigt deutlich, dass das antimikrobielle Material die Expression von Virulenzfaktoren von MRSA inhibiert und auf diese Weise die Biofilmbildung des multiresistenten Pathogens drastisch reduzieren kann. RT-qPCR-Studien mit weiteren Virulenzfaktoren von MRSA sind in Arbeit und zeigen ähnliche Tendenzen.

### Zusammenfassung und Ausblick

Durch diese Studie konnten wir belegen, dass die selbst regenerierende Oberflächenbeschichtung AGXX sehr gut geeignet ist, den bakteriellen Bewuchs drastisch zu reduzieren und damit die Gefahr für bakterielle Infektionen zu minimieren. In laufenden Arbeiten zum Einsatz dieser Beschichtung auf der ISS zeigt sich, dass sie auch zur wartungsfreien Dekontamination von Oberflächen über längere Zeiträume geeignet ist (maximale Untersuchungsdauer = 2 Jahre). Durch die wartungsfreie Langzeitwirkung der antimikrobiellen Beschichtung könnte auf häufige mikrobielle Kontaminationskontrollen verzichtet werden.

Die antimikrobielle Funktion der AGXX-Oberfläche erfordert weder elektrische Energie noch Licht. Weiterhin kann auf den Einsatz von Bioziden vollständig verzichtet werden. Lediglich die ausreichende Zufuhr von Luftsauerstoff sollte gewährleistet sein. Ein großer Vorteil der beschriebenen Technologie ist, dass sie sich ohne großen Aufwand in bestehende Systeme integrieren lässt, da beliebige Bauteile aus Metall, Glas oder verschiedenen Kunststoffen beschichtet werden können.

### Self-regenerating antimicrobial surface coating kills multi-resistant pathogens – micro galvanic cells produce reactive oxygen species

Due to the dramatic increase of the number of multi-resistant pathogens the demand of alternative agents to antibiotics to avoid microbial infections is steadily increasing. The use of silver-coated surfaces or silver nanoparticles is an option. However, many bacteria have developed silver resistance, and the cytotoxicity of nanoparticles causes problems in medical therapy. An alternative is AGXX®, a surface coating consisting of silver and ruthenium, conditioned with a vitamin-derivative, which produces reactive oxygen species that effectively kill diverse microorganisms. Resistance against it has not been observed so far. We could show that this coating not only kills multi-resistant pathogens such as MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, but also strongly reduces or even inhibits its biofilm formation. Based on quantitative Reverse Transcription PCR (RT qPCR) data we postulate a reaction mechanism for the inhibition of biofilm growth.

#### Key words

antimicrobial coating – silver – ruthenium – MRSA – biofilm

- 9 Baker J, Sitthisak S, Sengupta M et al. Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 150–160
- 10 Tseng CW, Zhang S, Stewart GC. Accessory gene regulator control of staphylococcal enterotoxin D gene expression. *J Bacteriol* 2004; 186: 1793–1801
- 11 Nübel U, Dordel J, Kurt K. A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000855
- 12 Schiwon K, Arends K, Rogowski KM et al. Comparison of antibiotic resistance, biofilm formation and conjugative transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* isolates from International Space Station and Antarctic Research Station Concordia. *Microb Ecol* 2013; 65: 638–651
- 13 Klingenberg C, Aarag E, Rønnestad A et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 817–822

#### Danksagung

Die Arbeiten im Labor von E. Grohmann wurden durch das Forschungsprojekt 50WB1466 des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt (DLR) gefördert. Wir bedanken uns bei der Firma Largentec GmbH Berlin für die Bereitstellung von AGXX und der Kontrollmaterialien. Außerdem möchten wir uns bei U. Landau und C. Meyer (Largentec GmbH Berlin) für die interessanten Diskussionen zum AGXX-Reaktionsmechanismus bedanken.

#### Literatur

- 1 Mijndonckx K, Leys N, Mahillon J et al. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biomaterials* 2013; 26: 609–621
- 2 Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol* 2006; 33: 17–34
- 3 Lansdown AB. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Adv Pharmacol Sci* 2010; 2010:910686. Epub 2010 Aug 24
- 4 Guridi A, Diederich AK, Aguila-Arcos S et al. New antimicrobial contact catalyst killing antibiotic resistant clinical and waterborne pathogens. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 50: 1–11
- 5 Küchler V. Molekulare Studien zur Antwort von *Staphylococcus aureus* auf Metallstress. Bachelor Arbeit Beuth Hochschule für Technik Berlin. 2016
- 6 Clauß-Lendzian E, de Jong A, Landau U et al. Stress response of a clinical *Enterococcus faecalis* isolate subjected to a novel antimicrobial surface coating. 2016 [in Review]
- 7 Bouchard A. AGXX glass microspheres, In vitro evaluation of cytotoxicity by neutral red assay using MRC-5 cell line with a direct contact procedure. Report 20100326STP, CERB, Baugy, France (Sponsor: APOGEPHA Arzneimittel GmbH Dresden, Germany) 2011
- 8 Clauß-Lendzian E. Differential gene expression of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* subjected to metal stress. Master Arbeit Universität Freiburg. 2014

#### Korrespondenz

Prof. Dr. Elisabeth Grohmann  
Fakultät für Life Sciences and Technology  
Beuth Hochschule für Technik Berlin  
Forum Seestraße  
Seestr. 64  
13347 Berlin  
elisabeth.grohmann@beuth-hochschule.de

#### Autorenerklärung

Der Autoren erklären, dass für dieses Werk keine Interessenkonflikte vorliegen.

DOI: 10.1055/s-0042-117209

Flug und Reisede 2016; 23 (5): 217–220

Georg Thieme Verlag KG

Stuttgart · New York

ISSN 1864-4538