

ZPRÁVA O MRSA

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1995) 35, 421-424

Citlivost na methicilin rezistenčního *Staphylococcus aureus* na siličný olej z *Melaleuca alternifolia*

C.F. Carson, B.D. Cookson, H.D. Farrelly a T.V. Riley,
oddělení mikrobiologie, The University of Western Australia, léčebné centrum Queen Elizabeth II, Nedlands, Západní Austrálie 6009, Austrálie

Všech 66 testovaných jedinců druhu Staphylococcus aureus prokázalo citlivost na siličný olej z Melaleuca alternifolia, neboli olej Tea Tree, při metodě diskového rozptylu a mikroskopického zředování modifikovaného živného roztoku. Z testovaných jedinců bylo 64 na methicilin rezistenčních druhu S. aureus (MRSA) a 33 rezistenčních na mupirocin. Hodnoty MIK a MBK byly u 60 australských jedinců 0,25% a 0,50% ve stejném pořadí. Spolupracovníky v Británii byly za použití podobných metod získány srovnatelné výsledky. Tyto výsledky in vitro naznačují, že tea tree oil může být v případě blokování přenosu MRSA vhodný.

Úvod

Přenos na methicilin rezistenčního druhu *Staphylococcus aureus* (MRSA) nemocničním personálem a pacienty a jeho následné rozmnožení je známou hrozbou nemocniční infekce. Pokusy o eliminaci přenosu MRSA často zahrnuje aplikaci povrchových preparátů jako je protistafylokoková látka mupirocin, která se osvědčila při předchozí eliminaci přenosu MRSA (Kauffman et al., 1993; Naguib, Naguib & Fournoy, 1993). Pohotovost na mupirocin rezistenčního MRSA (Rahman, Noble & Cookson, 1987; Janssen et al., 1993) představuje vážné nebezpečí při nutnosti zvládnutí přenosu MRSA našimi běžnými kapacitami a je tudíž nutné objevit vhodné alternativy k mupirocinu (Maple, Hamilton-Miller (Brumfitt, 1992). Siličný olej z *Melaleuca alternifolia* neboli olej Tea Tree má široké spektrum antimikrobiální působnosti a je relativně netoxický, je-li aplikován zevně. Je dostupný v širokém sortimentu různých složení, vhodných pro zevní použití a v Austrálii byl používán jako antiseptikum od 20. let 20. století (Carson (Riley, 1993). Walsh a Longstaff (1987) uvedli minimální inhibiční koncentraci (MIK) oleje Tea Tree u *S. aureus* 0,08%, zatímco Altman (1988) zjistil, že hodnoty MIK u rozsahu běžných patogenů včetně *S. aureus* byly mezi 0,5% a 1,0%. O citlivosti na olej Tea Tree je k dispozici jen málo doplňujících informací, částečně kvůli metodologickým problémům, které se objevovaly při testování oleje. Olej Tea Tree má omezenou rozpustnost ve vodním médiu a to může poškodit jeho výkon při některých testech na citlivost. Záměrem naší studie bylo vyzkoušet citlivost MRSA, jak na mupirocin citlivou, tak i rezistenční skupinu, na olej Tea Tree pomocí metod kotoučového rozptylu a mikroskopického zředování živného roztoku.

Materiály a metody

Bakteriální jedinci

Z Laboratoře pro infekční kontrolu při Sir Charles Gairdner Hospital v Perthu, Západní Austrálie bylo dodáno celkem 60 MRSA jedinců. V Západní Austrálii se objevily samostatné populace MRSA a na základě antimikrobiální rezistenční povahy, obsahu epizómu a genetické analýzy je lze rozdělit na východoaustralské čili epidemické MRSA (EMRSA) a

západoaustralské MRSA (WA MRSA) (Udo, Pearman (Grubb, 1993). Z vybraných jedinců bylo 54 považováno za WA MRSA, šest bylo EMRSA a 29 bylo rezistančních na mupirocin. Vedlejších šest jedinců druhu *S. aureus* bylo testováno v Laboratoři pro nemocniční infekce (LHI) v Colindale, UK. Tři jedinci, z nichž dva byli rezistenční na methicilin, vykazovali vysoký stupeň rezistence na mupirocin (MIK>512 mg/L). Na methicilin citlivý *S. aureus* (MSSA), který byl rezistenční na mupirocin vykazuje genetickou sondou rezistenci na mupirocin (Dyke et al., 1991; nezveřejněná pozorování). Jedinec MRSA, vykazující nízkou rezistenci na mupirocin (MIK 32 mg/L) a druh EMRSA-1 (Kerr et al., 1990) a jedinec MSSA, oba citliví na mupirocin, byli rovněž testováni. *S. aureus* NCTC 6571 byl použit jako kontrola pro všechna testování na citlivost.

Olej Tea Tree

Olej z *M. alternifolia* byl dodán společností Australian Plantations, Wyrallah, Nový Jižní Wales (Série č. HP03A) a vyhovoval Australskému Standardu (AS 2782-1985) v tom, že obsah 1,8-cineolu byl nižší než 15% (3,1%) a obsah terpinen-4-olu přesahoval 30% (35,7%).

Testování na citlivost

Citlivost na oleje Tea Tree byla určena metodou kotoučového rozptylu. Přes noc udržované kultury 60 MRSA a kontrolního *S. aureus* byly připraveny v živné infúzi srdce (HIB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), upraveny na 1,0 x 10⁸ cfu/mL a použity k naočkování Mueller-Hintonova agaru (Oxoid Ltd., Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, Anglie) zaplavením misek, odpuštěním nadměrného množství a ponecháním misek, aby uschly. Prázdný papírový kotouč (12,7 mm) (Schleicher (Schuell, Dassel, Německo) byl položen na povrch agaru a impregnován 30 (L oleje Tea Tree. Po naočkování byly misky aerobně inkubovány po 24 hodin při 37°C a inhibiční zóny změřeny. Každý test byl proveden trojmo a byla stanovena průměrná velikost zóny.

Za účelem kvantitativního vyjádření antibakteriální aktivity oleje z *M. alternifolia* oproti MRSA, byly pomocí metody mikroskopického zředování živného roztoku stanoveny minimální baktericidní koncentrace (MBK). Všechny testy byly provedeny v HIB doplněné o detergent Tween 80 (Atlas Chemical Industries Inc., Wilmington, DE, USA) na konečnou koncentraci 0,5%. Jako indikátor růstu k překonání problémů s kalností vlivem rozpustitelného oleje byl do HIB rovněž přidán trifenylnitrazoliumchlorid (TTC) (Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI, USA). Konečná koncentrace TTC po naočkování byla 0,005%. Sériově zdvojené roztoky oleje z *M. alternifolia* byly připraveny na 96-komorové misce (Falcon, Becton-Dickinson (Co., Lincoln Park, NJ, USA) v rozmezí 0,12-2,0%.

Přes noc udržované kultury byly připraveny jako předtím, ale upraveny tak, aby při očkovaní obsahovala každá komůrka zhruba 5,0 x 10⁵ cfu/mL. Do každého testu byly zahrnuty pozitivní i negativní růstové kontroly. Koncentrace každé očkovací látky byla potvrzena vyčíslením realizovatelné položky na talířích s krevním agarem (Oxoid). Talíře byly aerobně inkubovány při 37°C po 24 hodin a určeny hodnoty MIK a MBK. Redukce TTC posloužila jako indikátor bakteriálního růstu, ačkoliv neharmonizovala přesně ani s hodnotami MIK, ani s MBK. Za účelem potvrzení MIK a stanovení MBK hodnot, bylo z každé komůrky odebráno 10 (L živného roztoku a po kapkách naočkováno na krevní agar. Po celonoční aerobní inkubaci při 37°C byl stanoven počet přeživších organismů. Nejnižší koncentraci zaznamenala MIK, což mělo za následek značný nárůst (>90%) životaschopnosti u očkovací látky, zatímco MBK byla na bodě, kde přežila 0,1% či méně počáteční očkovací látky. Testování na LHI bylo provedeno v podstatě způsobem popsaným výše s výjimkou toho, že tea tree oil byl původně připraven v ethanolu (roztok 1:3), aby působil proti problému omezené rozpustnosti ve vodním médiu (Reynolds, 1993) po čemž následovaly sériové

roztoky v živné infúzi srdce a mozku (BHIB) (Oxoid), obsahující 0,5% Tweenu 80%. TTC nebylo do média přidáno, protože stupeň alkoholové rozpustnosti umožnil adekvátní možnost pozorovat růst očkovací látky.

Výsledky a diskuze

Všech 60 MRSA testovaných na olej Tea Tree metodou kotoučového rozptylu bylo citlivých, mělo průměrnou velikost zóny 27,0 mm (rozsah = 21,3-33,3; \bar{x} = 2,9 mm). Hodnoty MIK a MBK u 60 jedinců, jak bylo určeno metodou mikroskopického rozředování živného roztoku, byly všechny 0,25% a 0,50% ve stejném pořadí. Mezi na mupirocin citlivými a rezistantními MRSA neexistoval v citlivosti na olej Tea Tree žádný rozdíl. Hodnoty dosažené na LHI byly podobné, přičemž hodnoty MIK a MBK byly 0,312% a 0,625% ve stejném pořadí. Opět tu nebyl mezi na mupirocin citlivými a rezistantními druhy žádný rozdíl. Výskyt vysoké rezistance na mupirocin byl u MRSA hlášen jako 0% (Maple et al., 1992), 1,3% (Naguib et al., 1993) a 1,5% (Kauffman et al., 1993). Tato procenta ostře kontrastují s procentem vysoké rezistance na mupirocin (15,0%), vykázaným v nedávné studii MRSA, izolované ve WA (nezveřejněná sledování). Ve zmíněné studii se rezistance na mupirocin objevovala hlavně u WA MRSA, čímž byla podepřena domněnka Uda, Pearmana a Grubba (1994), že rezistance na mupirocin rapidně vzrostla v populaci WA MRSA. Vzhledem k takto vysoké rezistanci na mupirocin celkově u MRSA (Janssen et al., 1993) a specificky u WA MRSA (Udo et al., 1994) se zdá být přenosnou a mupirocin bude mít možná brzy nevalnou hodnotu při brzdění a léčbě MRSA. Univerzální citlivost na olej Tea Tree u všech testovaných jedinců MRSA a MSSA včetně těch, kteří byli rezistantní na mupirocin, představuje významný výsledek, který může najít uplatnění v kontrole MRSA.

Navzdory nerozpustnosti oleje Tea Tree ve vodním médiu se prokázalo testování kotoučovým rozptylem být rychlou a vhodnou metodou pro zhodnocení citlivosti MRSA na olej Tea Tree. Všichni jedinci vyprodukovali inhibiční zóny v rozsahu 21,3-33,3 mm a průměry těchto zón odpovídaly nízkým výsledkům MIK a MBK. Na základě výsledků MIK a MBK nemůže být žádný z jedinců považován za rezistantního. Naneštěstí nebylo možné z důvodu absence rozsahu výsledků MIK/MBK stanovit rozsah korelace mezi průměrem zóny a MIK/MBK. Hodnoty MIK a MBK však byly v dříve hlášených mezích (Walsh & Longstaff, 1987; Altman, 1988) a jsou znatelně pod hladinami koncentrací oleje Tea Tree, nalezeného ve většině složek běžně dostupných produktů (2-5%). Zbývá tedy stanovit účinnost těchto produktů v klinických podmínkách. Ačkoliv byl výskyt podráždění kůže při jejím vystavení účinkům oleje z *M. alternifolia* již hlášen, zdá se, že je vzácný (Apted, 1991) a vyžaduje další bádání.

Poděkování

Děkujeme jednotce pro kontrolu infekcí při Sir Charles Gairdner Hospital v Perthu, Západní Austrálii, za zprostředkování jedinců použitých v této studii.

Literatura

Altman, P.M. (1988). Australian tea tree oil (Australský tea tree oil). Australian Journal of Pharmacy 69, 276-8.

Apted, J.H. (1991). Contact dermatitis associated with the use of tea-tree oil (Kontaktní dermatitida spojená s používáním oleje Tea Tree). Australasian Journal of Dermatology 32, 177.

Carson, C.F. (Riley, T.V. (1993). Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Antimikrobiální účinky siličného oleje z *Melaleuca alternifolia*). Letters in Applied Microbiology 16, 49-55.

Dyke, K.G.H., Curnock, S.P., Golding, M. (Noble, W.C. (1991). Cloning of the gene conferring resistance to mupirocin in *Staphylococcus aureus* (Klonování genu, který propůjčuje druhu *Staphylococcus aureus* rezistanci na mupirocin). FEMS Microbiology Letters 77, 195-8.

Janssen, D.A., Zarins, L.T., Schaberg, D.R., Bradley, S.F., Terpenning, M.S. (Kauffman, C.A. (1993). Detection and characterisation of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* (Detekce a charakterizace rezistance na mupirocin u druhu *Staphylococcus aureus*). Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37, 2003-6.

Kauffman, C.A., Terpenning, M.S., He, X., Zarins, L.T., Ramsey, M.A., Jorgensen, K.A. et al., (1993). Attempts to eradicate methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from a long term care facility with the use of mupirocin ointment (Pokusy o vymýcení na methicilin rezistantního *Staphylococcus aureus* ze zdravotních zařízení pro dlouhodobý pobyt pomocí mupirocinové masti). American Journal of Medicine 94, 371-8.

Kerr, S., Kerr, G.E., MacKintosh, C.A. (Marples, R.R. (1990). A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales (Průzkum na methicilin rezistantního *Staphylococcus aureus*, postihujícího pacienty v Anglii a Walesu). Journal of Hospital Infection 16, 35-48.

Maple, P.A.C., Hamilton-Miller, J.M.T. (Brumfitt, W. (1992). Comparison of the in-vitro activities of the topical antimicrobials: azelaic acid, nitrofurazone, silver sulphadiazine and mupirocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Srovnání in vitro působení zevně aplikovaných antimikrobiotik: azelaové kyseliny, nitrofurazonu, sulfadiazinu stříbrného a mupirocinu na methicilin rezistantní *Staphylococcus aureus*). Journal of Antimicrobial Chemotherapy 29, 661-8.

Naguib, M.H., Naguib, M.T., (Flournoy, D.J. (1993). Mupirocin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from a veterans hospital (Rezistance na mupirocin u methicilin-rezistantního *Staphylococcus aureus* z veteránské nemocnice). Chemotherapy 39, 400-4.

Rahman, M., Noble, W.C., (Cookson, B. (1987). Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus* (Na mupirocin rezistantní *Staphylococcus aureus*). Lancet ii, 387.

Reynolds, J.E.F., Ed. (1993). Martindale - the Extra Pharmacopoeia. 30. vydání, str. 1385. Pharmaceutical Press, London.

Udo, E.E., Pearman, J.W. (Grubb, W.B. (1993). Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia (Genetická analýza pospolitých jedinců na methicilin rezistantního druhu *Staphylococcus aureus* v Západní Austrálii). Journal of Hospital Infection 25, 97-108.

Udo, E.E., Pearman, J.W. (Grubb, W.B. (1994). Emergence of high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia (Vývin vysoké rezistance na mupirocin u methicilin-rezistantního *Staphylococcus aureus* v Západní Austrálii). Journal of Hospital Infection 26, 157-65.

Walsh, L.J. (Longstaff, J. (1987). The antimicrobial effects of an essential oil on selected oral pathogens (Antimikrobiotické účinky siličného oleje na vybrané ústní patogeny). Periodontology 8, 11-5.