



Viti i IX-të i Botimit, Nr.1,

Qershori 2018

RAPORTIM MBI EFEKTIVITETIN IN VITRO TË DERIVATIT TË ACIDIT DIHIDROANTRACEN DISULFONIK NDAJ ENTEROBACTER CLOACAE

Florjana Rustemi*, Ledjan Malaj**, Gëzim Boçari***, Dritan Mnela****

* Departmenti i Farmacisë, Albanian University, Tiranë

**Departmenti i Farmacisë, Universiteti i Mjekësisë, Tiranë

***Departamenti Lëndëve Biomjekësore dhe Eksperimentale, Katedra e Farmakologjisë, Fakulteti i Mjekësisë, Universiteti i Mjekësisë, Tiranë

****-Qendra Spitalore Universitare “Nënë Tereza”, Tiranë

Adresë kontakti: florjanarustemi@gmail.com

Përmbledhje

Ky studim paraqet efektivitetin antibakterial *in vitro* të preparatit të derivatit të acidit dihidroantracen disulfonik (patenta DE102004003030A1) në një rast të diagnostikuar me Fasciit Nekrotizant, i cili ka rezultuar rezistent ndaj shumë antibiotikëve. Fasciiti Nekrotizant njihet kudo në botë si infeksion vdekjeprurës, por në studimin tonë *in vitro* paraqitet efektiviteti antibakterial i derivatit të acidit dihidroantracen disulfonik. Vlerësimi u krye me metodën e hollimit në bujon (Makrohollimi) në Laboratorin Mikrobiologjik të QSU “Nënë Tereza” Tiranë. Metoda konsiston në zvogëlimin në mënyrë progresive të sasisë së antimikrobikut në epruveta me bujon Mueller Hinton. Për studimin tonë u morën 12 epruveta, në epruvetën e parë morëm tretësirën 20% të preparatit që u testua kurse në epruvetat e tjera u zvogëlua përqendrimi i preparatit dhe sasia u plotësua me bujon Mueller Hinton. Pas hollimit 12 epruvetat u inkubuan dhe pas 24 orësh, u kultivuan në pjata petri në terren MacConkey për 24 orë. Nga studimi ynë rezultoi se efektiviteti antibakterial *in vitro* i derivatit të acidit dihidroantracen disulfonik është ekuivalent me efektin *in vitro* të Imipenem (MIC≤0.25), Meropenem (MIC≤0.25), Amikacin (MIC 8), Colistin (MIC≤0.5) në shtamin e izoluar *Enterobacter Cloacae*. Nevojiten studime dhe rezultate të tjera në mënyrë që të kemi një spektër të plotë të aktivitetit antibakterial të derivatit të acidit dihidroantracen disulfonik.

Fjalë çelës: *in vitro*, efektivitet antibakterial, derivat i acidit dihidroantracen disulfonik.

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DIHYDROANTHRACENE DISULFONIC ACID DERIVATIVE AGAINST ENTEROBACTER CLOACAE

Abstract

This paper is a report of the *in vitro* antibacterial activity of the dihydroanthracene disulfonic acid derivative preparation (patent DE102004003030A1) against a case diagnosed with Necrotizing Fasciitis that resulted resistant to many antibiotics. Necrotizing Fasciitis is known for his high lethality, but our *in vitro* study demonstrated the antibacterial effectiveness of dihydroanthracene

disulfonic acid derivative. We decided to use the method of dilution in broth (Macrodilution) in the Microbiological Laboratory of the UHC “Mother Theresa” Tirana. The method consists in progressively decreasing the amount of the antimicrobial preparation in the test tubes with Mueller Hinton. In our case, we collected 12 test tubes. In the first test tube we poured a 20% solution of dihydroanthracene disulfonic acid derivative, which activity we wanted to test and in all the other test tubes we progressively decreased the amount of our preparation and added Mueller Hinton. After the dilution we incubated the 12 test tubes for 24 hours and we cultivated the above in plates with MacConkey broth for 24 hours. *In vitro* antibacterial effect of dihydroanthracene disulfonic acid derivative is equivalent with the *in vitro* effect of Imipenem (MIC $\leq$ 0.25), Meropenem (MIC $\leq$ 0.25), Amikacin (MIC 8), Colistin (MIC $\leq$ 0.5) in the isolated strain of *Enterobacter Cloacae*. Further studies are needed to evaluate the full pharmacological activity of dihydroanthracene disulfonic acid derivative.

Keywords: *in vitro*, antibacterial activity, dihydroanthracene disulfonic acid derivative.

Hyrje

U vlerësua efektiviteti antibakterial *in vitro* i preparatit të ri të derivatit të acidit dihidroantracen disulfonik. Derivati i acidit dihidroantracen disulfonik, (patenta DE102004003030 A1, klasifikimi: IPCA61K31 / 185, aplikim datë 01.09.2005, publikim Nr: DE102004003030 A1), është preparat antibakterial dhe antiviral me spektër të gjerë veprimi.

Sinteza kimike realizohet, duke futur të bashkëveprojnë në reaksione kimike 10 lëndë me pastërti prosintezë. Është e domosdoshme disiplina teknike sipas metodikës duke filluar nga radhitja e hedhjes në reaktorin e reaksionit kimik, koha e përzierjes, pauza pas hedhjes së reagentit të radhës, ruajtja e temperaturave optimale gjatë reaksionit sipas reagentëve që hidhen në reaktorin e reaksionit. Reaksioni kimik vazhdon për 36 orë dhe kërkon një kujdes të veçantë pasi çdo devijim teknologjik prish mbarëvajtjen e reaksionit kimik ndërmjet reagentëve. Sinteza e preparatit kërkon përdorim të shpejtë të mjetit ftohës të reaktorit për të shmangur ngritjen përtej normës së lejuar të temperaturës. Përmbajtja përfundimtare e reaksionit është një masë kristallore e trashë, e cila vendoset në tava tharëse me një shtresë 07 mm – 08 mm me ventilim ajri me temperaturë 45°C – 50°C. Pas tharjes, lënda e përfutur bluhet si pluhur i imët. Në përfundim preparati i përfutur duhet të ketë lagështi 1 deri në 2% dhe pH në tretësirë 7,4 – 7,6. Një cikël prodhimi llogaritet të zgjasë minimalisht 36 orë pune.

Produkti përfundimtar në formë kristali, ka ngjyrë kafe të errët, me aromë shpuesë karakteristike, të ngjashme me esteret, ka shije të fortë me nuancë **të ngjashme me atë të jodit dhe rozmarinës**, tretet mirë **në ujë (deri 40%)**, në glicerinë, në vaj dhe në tretës të tjerë dhe është i qëndrueshëm ndaj temperaturës.

Nuk janë vërejtur efekte toksike në kafshët eksperimentale. Dozat më të larta shkaktojnë diateza hemorragjike, konvulsione, vdekje. Në lepuit e vegjël, doza 1g/kg e injektuar intravenoz tri herë në një **interval 1.5 orë nuk ka shkaktoar çrregullim të dukshëm klinik dhe në ekzaminimet fizpatologjike të organeve nuk u vunë re ndryshime patologjike në organe**. Preparati ruhet në temperaturën e zakonshme të ambientit, larg dritës, **në enë të mbyllura për tu mbrojtur nga lagështia**.

Metodologjia

Efektiviteti antibakterial i preparatit të ri u vlerësua *in vitro*. Studimi u realizua me shtamet rezistente të izoluar në një rast të diagnostikuar me Fasciit nekrotizant ^(3,4,5) në Laboratorin Mikrobiologjik të

QSU “Nënë Tereza” Tiranë.

Vlerësimi u krye me metodën e hollimit në bujon (Makrohollimi) ⁽²⁾.

Metoda konsiston në zvogëlimin në mënyrë progresive të sasisë së antimikrobikut në epruveta me bujon Mueller Hinton, siç tregohet në Tabelën 1. Në rastin tonë u morën 12 epruveta (100 x 13 mm) ku tek epruveta e parë u hodhën 2 ml tretësirë 20% të preparatit që testojmë kurse në epruvetat e tjera, u zvogëlua në mënyrë progresive përqendrimi i preparatit dhe tek epruveta e fundit u hodhën 2 ml bujon Mueller Hinton.

Me pipetë sterile u mor 1 ml preparat eksperimental nga epruveta e parë dhe u hodh tek epruveta e dytë, nga epruveta e dytë u mor 1 ml dhe u hodh tek epruveta e tretë. Kjo procedurë u përsërit deri tek epruveta e 10^{te}, nga e cila 1 ml derdhet jashtë. Kështu kemi kryer hollimin e preparatit, duke përgjysmuar përqendrimin e tij në çdo kalim, respektivisht në epruvetën e parë kemi përqendrimin maksimal (X) kurse në epruvetën e dytë X/2 e kështu me radhë si në Tabelën 1. Epruveta e 11^{te} ka vetëm 1 ml bujon kurse epruveta 12^{te} ka 2 ml bujon. Çdo kalim bëhet me pipetë të re sterile.

Tabela 1. Përgatitja e epruvetave me **përqendrime** të ndryshme të preparatit

Epruveta Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hollimi preparatit	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	0 Bujon 1 ml	0 Bujon 2 ml
Përqendrimi Preparatit	20 %	10 %	5 %	2.5 %	1.25 %	0.625 %	0.312 %	0.156 %	0.078 %	0.039 %	Kontroll pozitiv	Kontroll negativ

Në një epruvetë me 5 ml NaCl u hodhën 3-5 koloni bakteriesh *Enterobacter Cloacae*, duke përfutur një pezulli me densitet 0.5 McFarland, që ka $1-2 \times 10^8$ CFU/mL.

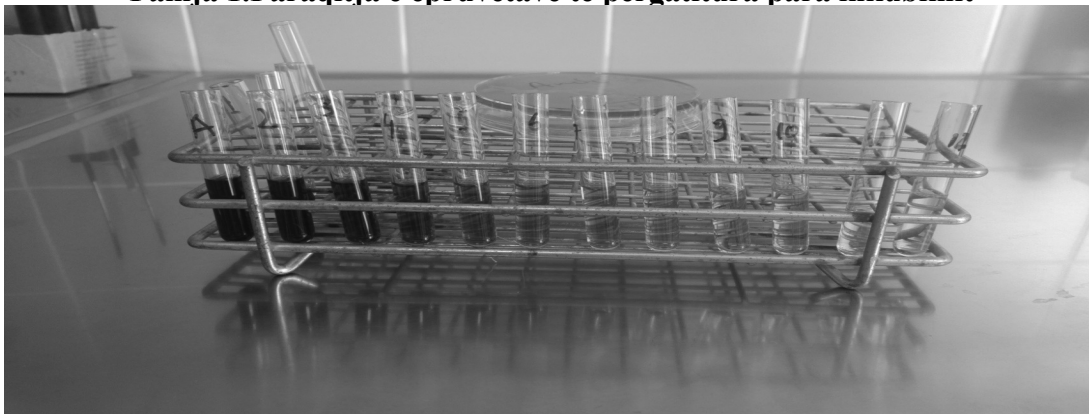
Pezullia e përfutur u hollua në raporte 1:150 me bujon Mueller Hinton duke përfutur një pezulli me densitet bakterial 1×10^6 CFU/mL.

Nga pezullia e përfutur u mor nga 1 ml kulturë bujonike dhe u hodh në secilën epruvetë përveç 2 epruvetave të fundit, siç tregohet edhe në Tabelën 2 dhe Pamjen 1.

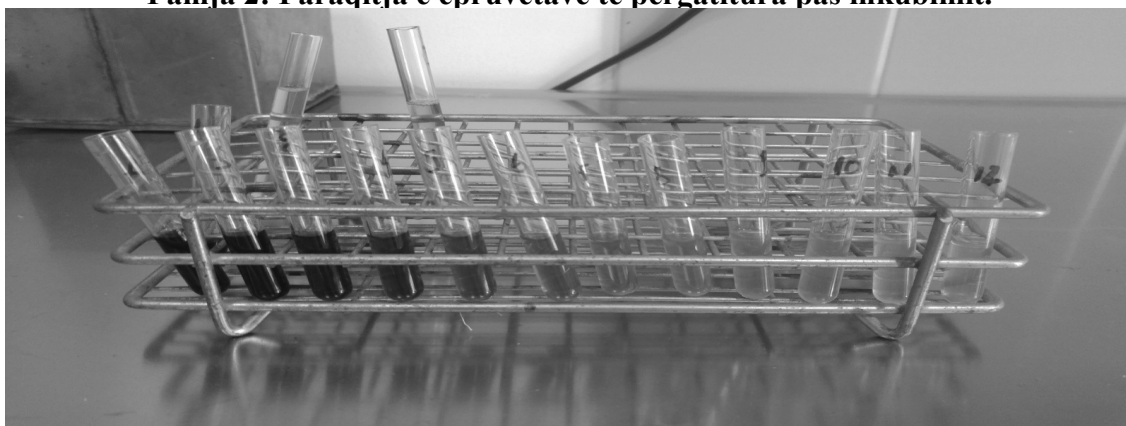
Në këtë rast bëhet hollimi $\frac{1}{2}$ duke holluar përsëri preparatin eksperimental dhe duke holluar kulturën bujonike dhe në këtë rast përftohet densitet bakteror 5×10^5 Cfu/mL.

Tabela 2. Përqindja e preparatit në secilën epruvetë

Epruveta Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C preparatit	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0	0
Cfu/mL	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	0

Pamja 1. Paraqitja e epruvetave të përgatitura para inkubimit

Bëjmë inkubimin në 37°C për 18-24 orë.

Pamja 2: Paraqitja e epruvetave të përgatitura pas inkubimit.

Pas inkubimit të secilës epruvetë në 37°C për 24 orë (Pamja 2), u kultivuan në pjata petri me terren MacConcey, u inkubuan në 37°C për 24 orë dhe u krye leximi për secilin rast siç tregohet në Tabelën 3.

Në rastin tonë kemi rritje në të gjitha pjatat përveç pjatës që i korrespondon epruvetës së parë me përqendrimin e preparatit eksperimental X/2 dhe në epruvetën e fundit që ka vetëm bujon.

Tabela 3. Rezultatet e përftuara pas inkubimit

Epruveta Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C preparatit	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0	0
Rritja në pjata	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Rezistenca	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R		

Shtami i izoluar nga Fasciiti nekrotizant⁵ ishte *Enterobacter Cloacae*, i cili në antibiogramën e realizuar me VITEK 2 (Tabela Nr. 4) rezulton ⁽¹⁾:

Tabela 4. Rezultatet e antibiogramës

Antimikrobiale	MIC	Interpretim	Antimikrobiale	MIC	Interpretim
Ampicillin/Sulbactam	-		Amikacin	8	S
Piperacillin/Tazobactam	-		Gentamicin	≥ 16	R
Cefoxitin	≥ 64	R	Ciprofloxacin	≥ 4	R
Ceftazidim	16	R	Levofloxacin	4	I
Ceftriaxone	≥ 64	R	Tigecycline	4	I
Cefepime	≥ 64	R	Fosfomicin	≥ 256	R
Aztreonam	≥ 64	R	Colistin	≤ 0.5	S
Imipenem	≤ 0.25	S	Trimetoprim/ sulfamethoxazole	40	S
Meropenem	≤ 0.25	S			

Preparati derivat i acidit dihidroantracen disulfonik në tretesirë 10% *in vitro* ka një efekt antimikrobiale.

Ky efekt antimikrobiale i preparatit eksperimental është i barazvlefshëm me efektin *in vitro* të Imipenem (MIC ≤ 0.25), Meropenem (MIC ≤ 0.25), Amikacin (MIC 8), Colistin (MIC ≤ 0.5), Trimetoprim/sulfamethoxazole (MIC 40) në shtaminë e izoluar *Enterobacter Cloacae*.

Figura 1. Shtami i izoluar i *Enterobacter Cloacae* në MacConkey (kolonitë ngjyrë rozë)**Figura 2. Rritja në MacConkey për epruvetat 1, 2, 3, 4**

Figura 3. Rritja në MacConkey për epruvetat 5, 6, 7, 8**Figura 4. Rritja në MacConkey për epruvetat 9, 10, 11, 12**

Përfundime

Efektiviteti antibakterial *in vitro* i derivatit të acidit dihidroantracen disulfonik është ekuivalent me efektin *in vitro* të Imipenem (MIC≤0.25), Meropenem (MIC≤0.25), Amikacin (MIC 8), Colistin (MIC≤0.5), Trimetoprim/sulfamethoxazole (MIC 40) në shtamin e izoluar *Enterobacter Cloacae*. Nevojiten studime dhe rezultate të tjera në mënyrë që të kemi një spektër të plotë të aktivitetit antibakterial të derivatit të acidit dihidroantracen disulfonik.

Referenca

1. Franklin R. Cockerill, III, Matthew A. Wikler, Jeff Alder et al. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI); Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition; M07-A9; Vol. 32; No. 2; January 2012; 16-40.
2. Jean B. Patel, Franklin R. Cockerill III, Patricia A. Bradford et al. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI); Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement; M100-S25; Vol. 35; No. 3; January 2015; 158-178.
3. Swain RA, Hatcher JC, Azadian BS, et al. A five-year review of necrotizing fasciitis in a tertiary referral unit. Annals of The Royal College of Surgeons of England Vol. 95(1):57-60, January 2013.
4. Jacqueline A. Roemmele, Donna Batdorff. Surviving the Flesh-Eating Bacteria Understanding, Preventing, Treating, and Living with the Aftermath of Necrotizing Fasciitis; Second Edition; July 2015; 84-108.
5. Vayvada H, Demirdover C, Menderes A, Karaca C. Necrotizing fasciitis: diagnosis, treatment and review of the literature. Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery (*Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.*) November 2012; 18(6):507-13.