

ELS EFECTES DELS ANTIBIÒTICS SOBRE ELS BACTERIS

Zaida Codina Ferrer, Marc Carrillo Suárez.
IES Badalona VII. Tutora: J. Tous. 2n de Batxillerat.

MOTIVACIÓ

Ens hem decidit a fer aquest treball per la curiositat que ha despertat en nosaltres aquest tema, ja que l'ús dels antibiòtics és present en la vida quotidiana per a guarir malalties causades per bacteris presents en la nostra societat.

Un altre factor que ens hi ha fet decantar ha estat que aquest treball no únicament es basa en un buidatge bibliogràfic, sinó que té una part experimental molt important, a partir de la qual podrem extreure o elaborar les nostres conclusions.

OBJECTIU

L'objectiu al qual volem arribar és comprovar –mitjançant les experiències que realitzarem– com actuen els antibiòtics sobre els bacteris. A partir d'aquestes experiències podem arribar a una conclusió. Aquesta conclusió no serà una novetat del treball ja que sobre aquest tema ja s'han fet els estudis i s'han tret les conclusions pertinents. Tot i això, nosaltres elaborarem conclusions a partir dels nostres resultats.

AGRAIMENTS

El nostre treball ha estat molt seguit per Reactivos para diagnosticos S.L. i més especialment per M. Àngels Martínez (adjunta a gerència), la qual ens ha pogut permetre una visita als laboratoris de l'empresa. Irene Fuentes, biòloga del laboratori, ha estat la persona que ens ha proporcionat informació sobre la pràctica i que ens ha permès de realitzar-la en els mateixos laboratoris. Per aquest suport i interès respecte al nostre treball volem que hi siguin presents d'alguna forma en el nostre treball.

També voldríem agrair la col·laboració d'ien Xavier Carrillo Suárez, estudiant de quart de medicina, que ens ha facilitat informació, bé de llibres bé d'apunts acadèmics.

Una altra part col·laboradora del treball ha estat el professorat.

BACTERIS

1.- Definició

ELS BACTERIS

Els bacteris són organismes unicel·lulars d'estructura procariota que fan entre 1 i 10 micres. En els bacteris hi podem veure estructures obligades i estructures facultatives. Es poden trobar en qual·sevol ambient, fins i tot en aquells que per les seves condicions físiques es podria pensar que no contenen cap forma de vida.

CÈL·LULA PROCARIOTA: Aquest tipus de cèl·lules es caracteritzen pel fet de no tenir nucli delimitat per una membrana, de manera que el material genètic no hi queda separat del citoplasma.

ESTRUCTURES OBLIGADES: Són necessàries per a poder existir:

1. Paret cel·lular
2. Membrana cel·lular.
3. Ribosomes
4. ADN cromosòmic

ESTRUCTURES FACULTATIVES: Els fan la vida més agradable i els donen molts avantatges. No són necessàries per a replicar-se:

- | | |
|------------|---------------------------------------------------|
| 1. Flagels | 2. Pili o fimbries |
| 3. Càpsula | 4. Estructures internes---- ADN extra cromosòmic. |

2- Trets històrics

Els bacteris van ser descrits per primera vegada pel naturalista holandès Anton van Leeuwenhoek, que els va observar amb l'ajuda d'un microscopi simple construït per ell mateix. Va comunicar el seu descobriment a la Reial Societat de Londres el 1683.

Però la bacteriologia no es va desenvolupar com a ciència fins a mitjans del segle XIX. En efecte, durant casi 200 anys es pensava que els bacteris apareixien per generació espontània, i va caldre l'esforç d'unes quantes generacions de químics i de biòlegs per a demostrar que, com tots els éssers vius, els bacteris es reproduïen a partir d'uns altres.

Aquest fonament va ser establert definitivament al 1860 pel científic francès Louis Pasteur, el mateix que va descobrir l'origen bacterià dels processos de fermentació i de moltes malalties infeccioses.

La primera classificació sistemàtica dels bacteris va ser publicada el 1872 pel biòleg alemany Ferdinand J. Cohn, qui els situava en el regne dels vegetals. Avui dia formen part del regne dels moneres.

El 1876 Robert Koch va dissenyar el mètode a per inocular bacteris en un medi nutritiu, per poder cultivar-los i estudiar-los.

El 1880 es va iniciar el coneixement científic de la immunitat davant dels bacteris: Pasteur va descobrir que tots els animals inoculats amb bacteris dèbils eren resistents a la infecció. Des d'aquest moment podem dir que va néixer la prevenció a partir de la immunitat, un dels avenços més importants de la medicina actual.

3.- Classificació dels bacteris

3.1.- FORMES EXTERNES DELS BACTERIS: Els bacteris poden adoptar formes diverses com les següents:

- Bacils: Tenen forma allargada i cilíndrica com un bastonet. Es poden trobar en forma de cadenes lineals o ramificades.
- Cocs: Amb aspecte arrodonit i més petits que els bacils. A vegades apareixen aïllats o de dos en dos (diplococs), fent cadenes (estreptococs), en grups arraimats (estafilococs) o en masses (sarcines).
- Espiril·les: Tenen forma d'espiral o d'hèlix. Les espiroquetes són com els espirils, però amb una forma d'espiral més acusada
- Vibrions: Tenen forma d'una soma i són molt curts i corbats.

3.2.- MORFOLOGIA DELS BACTERIS

Tenen una estructura molt més simple que les cèl·lules eucariotes, ja que no tenen estructures membranoses dins el citoplasma i, per tant, no hi ha òrgànuls cel·lulars. En no formar-se aquestes estructures membranoses, tampoc no es forma el nucli cel·lular com en les cèl·lules eucariotes. El material nuclear, l'ADN, es troba en el citoplasma i pren el nom de nucli bacterià.

Així, doncs, una cèl·lula bacteriana és formada per membrana citoplasmàtica i citoplasma. Per fora de la membrana citoplasmàtica hi ha unes altres estructures, com ara la paret bacteriana, que es troba en tots els bacteris, i les càpsules, que són exclusives d'alguns.

3.3.- ESTRUCTURES OBLIGADES I FACULTATIVES DELS BACTERIS

ESTRUCTURES OBLIGADES

- PARET BACTERIANA: La paret bacteriana és un embolcall rígid que envolta i separa la membrana citoplasmàtica del medi extern i actua com a quelet extern del bacteri.

La paret cel·lular es considera un element obligat dels bacteris, i de fet constitueix un dels elements característics de la cèl·lula procariota.

El component més important de la paret és un peptidoglicà, també anomenat mureïna.

Segons l'estructura de la paret, els bacteris responen d'una manera diferent a la tinció habitual de GRAM i per això es classifiquen en bacteris grampositius i bacteris gramnegatius.

Bacteris grampositius: La seva paret és formada per diverses capes de peptidoglicà, que per la part més externa s'enllaça amb molècules d'àcid teicoic. Aquesta distribució del peptidoglicà fa que la paret d'aquests bacteris sigui més gruixuda, uniforme i densa i en la tinció de GRAM queda tenyida.

Bacteris gramnegatius: La seva paret és formada per una sola capa prima de peptidoglicà, cosa que fa que en la tinció de GRAM no quedi tenyida.

Conèixer l'estructura de la paret dels bacteris, és a dir Gram+ o Gram-, és de molta importància ja que els antibiòtics actuen sobre aquesta paret.

La funció principal de la paret cel·lular és mantenir la forma i el volum del bacteri, i evitar que aquest es destrueixi per un augment de la pressió externa o interna. D'altra banda, la paret cel·lular es comporta com un filtre, ja que té porus diminuts que permeten el pas –en un sentit i en un altre– d'aigua, minerals i petites molècules.

- **MEMBRANA CITOPLASMÀTICA:** La membrana citoplasmàtica dels bacteris és una estructura obligada, ja que la tenen tots els bacteris, formada bàsicament per proteïnes i fosfolípids, que envolta el citoplasma i el separa de la paret cel·lular.

Aquesta membrana mostra una forma d'una doble capa lipídica on la part no polar del lípid queda a l'interior i a l'exterior si disposa la part polar.

La membrana citoplasmàtica exerceix una funció de barrera que aïlla i protegeix les estructures citoplasmàtiques i el nucli bacterià.

En uns punts determinats, la membrana citoplasmàtica bacteriana s'invagina, és a dir, es projecta cap a l'interior de la cèl·lula bo i formant uns envans intracel·lulars que s'anomenen mesosomes

Els mesosomes poden ser centrals, quan divideixen la cèl·lula més o menys per la meitat, o bé laterals, quan es disposen paral·lels i propers a la membrana citoplasmàtica.

Els mesosomes centrals constitueixen l'estructura inicial a partir de la qual els bacteris es divideixen.

Els mesosomes laterals tenen formes tubulars, laminades o dendrítiques i són rics en enzims o proteïnes que regulen reaccions químiques del metabolisme bacterià. Tenen una funció similar a la dels mitocondris de les cèl·lules eucariotes, és a dir, proporcionen energia al medi intracel·lular

- **EL CITOPLASMA BACTERIÀ:** El citoplasma bacterià és una substància gelatinosa, formada per un vuitanta-cinc per cent d'aigua, delimitada per la membrana citoplasmàtica per fora. Conté, entre més elements, el nucli bacterià.

El citoplasma bacterià conté, bàsicament, dos tipus d'estructures: els ribosomes i les anomenades inclusions citoplasmàtiques.

Els ribosomes són les estructures encarregades d'elaborar les proteïnes que el bacteri emprà en el seu metabolisme. Són corpuscles similars als que tenen les cèl·lules eucariotes, formats també per dues subunitats, però són més petits. Es troben dispersos pel citoplasma bacterià, aïllats o associats a molècules d'ARN.

Les inclusions citoplasmàtiques comprenen els anomenats vacúols, que són acumulacions de líquids o gasos, i unes formacions sòlides que constitueixen substàncies de reserva i serveixen per a emmagatzemar fosfats, lípids, glucídics i proteïnes.

ESTRUCTURES FACULTATIVES

- **EL NUCLI BACTERIÀ:** Malgrat que els bacteris no tenen pròpiament nucli, aquest nom serveix per a fer referència al material hereditari que tenen.

Aquest material és constituït per una sola molècula d'ADN circular que forma un sol cromosoma. Aquest cromosoma es col·loca en una zona del citoplasma que és menys densa que la resta.

L'ADN d'aquest cromosoma adopta una estructura en doble hèlix, però no està unit a proteïnes. El filament del cromosoma es troba enrotllat sobre ell mateix i forma un cabdell. (ADN CROMOSÒMIC)

Nombroses espècies de bacteris poden tenir un nombre variable de fragments d'ADN dispersos en el citoplasma, és a dir, fora del nucli cel·lular. Aquestes molècules formen unes estructures anomenades plàsmids. (ADN EXTRACROMOSÒMIC).

Els plàsmids contenen una informació genètica que no és essencial per al bacteri (estructures facultatives), per bé que contribueix a la seva supervivència i a la seva adaptació al medi.

- **ELS FLAGELS BACTERIANS:** Alguns bacteris tenen estructures destinades al moviment anomenades flagels.

Els flagels bacterians tenen una estructura molt diferent dels flagels de les cèl·lules eucariotes. Són uns filaments prims, sinuosos i flexibles, que s'insereixen per la base a la membrana citoplasmàtica i a la paret cel·lular en unes estructures discoidals; l'extrem lliure es projecta per fora del bacteri.

El diàmetre dels flagels oscil·la entre 10 i 20 nm i la llargada entre 2 i 20 micròmetres.

Són formats per una proteïna anomenada flagel·lina, que té la propietat de contreure's com les fibres del teixit muscular. Cada flagel té entre tres i onze fibril·les de la flagel·lina trenades helicoidalment com una corda.

- **LA CÀPSULA:** La càpsula és un embolcall prim i semicompacte que cobreix externament la paret cel·lular d'algunes espècies de bacteris. Com que no tots els bacteris tenen càpsula, es pot dir que aquesta és una estructura facultativa.

Es formada bàsicament per glúcids i proteïnes.

La càpsula sol contenir un sol bacteri, però en nombroses espècies engloba dues o més cèl·lules bacterianes.

La funció de la càpsula és protegir els bacteris de la sequedat ambiental i de la fagocitosi per altres cèl·lules defensives dels organismes com els leucòcits. També són una defensa per als anticossos i per a la infecció per virus. Per tot això, els bacteris que tenen càpsula són més resistents i, per tant, més virulents.

La càpsula, però, no és un criteri de classificació, perquè els bacteris formen la càpsula o no la formen, segons quines siguin les condicions del medi en què viuen.

- **LES FÍMBRIES:** Les fimbries són uns filaments rígids i prims que, com els flagels, s'insereixen per la seva base a la membrana citoplasmàtica i a la paret cel·lular i es projecten cap al medi extern. Ara bé, a diferència dels flagels no tenen mobilitat pròpia.

El diàmetre de les fimbries oscil·la entre 7 i 8 nm. Segons la llargada, el nombre en què es presenten i les propietats que els corresponen es considera que hi ha dos tipus de fimbries:

Les fimbries comunes, que són curtes i nombroses, i que tenen per funció augmentar el poder d'adherència entre els bacteris i les superfícies en què s'estableixen.

Els pilis són més llargs i poc nombrosos (1 i 4 per bacteri). La seva funció és fer de pont entre els bacteris que posseeixen plàsmids perquè aquests puguin ser transferits de bacteri a bacteri.

4.- Reproducció i genètica bacteriana

Els bacteris es reproduïxen dividint-se en dos, gràcies a un mecanisme similar al de les cèl·lules de la majoria d'organismes.

El mecanisme de divisió de la cèl·lula bacteriana comprèn una fase de repòs, en què es produeixen lleus modificacions en les estructures de la reproducció cel·lular, i una fase activa, durant la qual aquestes estructures experimenten modificacions substancials.

Durant la fase de repòs, el mesosoma central, format per un plec de membrana citoplasmàtica, forma un envà transversal incomplet, ja que per la part central no és tancat, sinó que deixa una sola obertura que abasta la major part del diàmetre de la cèl·lula. Durant aquesta fase, igualment l'ADN nuclear, que constitueix el motor de la divisió cel·lular, roman proper a un determinat sector del mesosoma central.

La fase activa de la reproducció de la cèl·lula bacteriana s'inicia quan l'ADN nuclear es replica, és a dir, quan s'elabora una nova molècula d'ADN idèntica a l'original. Després les molècules d'ADN s'allunyen les unes de les altres de manera que cadascuna constituirà l'ADN nuclear de les dues cèl·lules filles que es van formant. Paral·lelament, els altres components del nucli bacterià i del citoplasma es distribueixen als dos costats de la cèl·lula mare. Finalment el mesosoma central es tanca i es formen els nous sectors de la paret cel·lular en el seu interior, de manera que les dues noves cèl·lules queden del tot constituïdes.

Durant la fase de repòs, els bacteris es desenvolupen i creixen, i es preparen per reproduir-se. La durada de la fase de repòs varia molt segons les espècies i les condicions físiques i químiques de l'ambient, i poden anar des d'algunes desenes de minuts fins a dies.

Contràriament, la durada de la fase activa de la reproducció bacteriana depèn més de l'espècie del bacteri que no pas del medi extern. En la majoria d'espècies, la fase activa de reproducció es desenvolupa en un període de temps que oscil·la entre vint i seixanta minuts.

Un cop s'ha acabat el cicle reproductiu, les cèl·lules bacterianes filles es poden separar i allunyar entre elles, impulsades per corrents de líquids o per pressions externes. Sovint, però, continuen propers i fins i tot adherides entre elles bo i formant colònies o aglomeracions de bacteris, que poden contenir milers o milions d'individus. La tendència a formar colònies és més habitual en els bacteris que no tenen mobilitat pròpia, i generalment es produeix quan els bacteris s'assenten en un medi propici.

A més d'aquest tipus de reproducció asexual, els bacteris tenen un conjunt de mecanismes anomenats parasexuals, mitjançant els quals s'intercanvien fragments d'ADN.

L'intercanvi d'informació genètica d'un bacteri a un altre es pot fer per transformació, transducció i conjugació.

- Transformació: Consisteix en l'intercanvi genètic que es produeix quan un bacteri és capaç de captar fragments d'ADN d'un altre bacteri que es troben dispersos en el medi.
- Transducció: En aquest cas, la transferència de material genètic es fa a través d'un virus bacteriòfag que infecta un bacteri després d'haver-ne infectat prèviament un altre. Durant aquest procés transmet material genètic del primer al segon.
- Conjugació: la transferència de material genètic es fa des d'un bacteri donador a un altre de receptor a través dels pili. Els bacteris donadors o bacteris F⁺ tenen uns pàsmidis anomenats factors F, que són els que transfereixen durant la conjugació. Els bacteris receptors o bacteris F⁻ es converteixen en bacteris F⁺, mentre que el bacteri F⁺ no perd la seva condició perquè hi ha diverses còpies del factor F en el seu citoplasma.

A vegades el factor F és integrat en el cromosoma bacterià, com és el cas dels bacteris Hfr (alta freqüència de recombinació). Els bacteris Hfr poden transferir la totalitat del seu cromosoma, però primer han de duplicar-lo. Generalment només en transfereixen alguns fragments, ja que els pili són fràgils i es trenquen abans no han aconseguit de transferir tot el cromosoma.

5.- Metabolisme bacterià

Definirem metabolisme com el conjunt de reaccions químiques que succeeixen dins una cèl·lula, ja siguin catalitzades o no. Havent definit el metabolisme, ens centrarem en les maneres que tenen els bacteris d'obtenir aliment per poder portar a terme aquestes reaccions químiques.

Coneixem dos grups principals de bacteris: els sapròfits, que viuen sobre els cossos morts d'animals i vegetals, i els simbiòtics, que viuen en animals i vegetals.

Els sapròfits són importants perquè descomponen els cossos de les plantes i els animals morts transformant-los en matèria inorgànica que serà utilitzada pels vegetals per fer la fotosíntesi (cicle de la matèria, són els descomponedors).

De bacteris simbiòtics n'hi ha tres tipus:

- Els que mantenen una relació de mutualisme amb el seu hoste. En aquesta relació cap dels dos organismes es veu perjudicat i arriben a ser indispensables l'un per a l'altre.
- Els que mantenen una relació de comensalisme amb l'hoste. En aquesta relació el bacteri obté benefici de l'hoste tot provocant-li lesions considerables.
- Els que mantenen una relació de parasitisme amb el seu hoste. En aquesta relació els bacteris obtenen tot els beneficis possibles de l'hoste fins que li provoquen la mort.

L'activitat de molts bacteris és utilitzada avui dia per l'ésser humà per produir molts productes alimentaris (formatge, iogurt, etc.). Els bacteris també són aprofitats en el sector de la indústria (producció de tabac, adobament de cuirs, etc.)

6.- Poder patògen dels bacteris

Que un bacteri sigui patògen vol dir que causa malalties en l'ésser humà. Aquestes malalties s'anomenen infeccioses. Quasi 200 espècies de bacteris són patògens per als humans. L'efecte patògen varia molt en funció de les espècies i depèn molt de la virulència d'aquestes espècies en particular i de les condicions de l'organisme hoste.

Malalties infeccioses bacterianes més conegudes: El còlera, el tètanus, la gangrena gasosa, la lepra, la pesta, la tuberculosi, la sífilis, la febre tifoide, la diftèria, la febre ondulant i moltes formes de pneumònia.

Fins al descobriment dels virus, els bacteris van ser considerats els agents patògens de totes les malalties infeccioses.

Els efectes patògens dels bacteris en els teixits, els podem agrupar en les quatre classes següents:

- Efectes provocats per l'acció directa local del bacteri sobre els teixits, com la gangrena gasosa causada pel *Clostridium perfringens*.
- Efectes mecànics, com en el cas d'un grup de bacteris que bloqueja un vas sanguini i provoca un èmbol infecciós.
- Efectes de resposta de l'organisme enfront de certes infeccions bacterianes en els teixits, com les cavitats formades en els pulmons en la tuberculosi, o la destrucció de teixit en el cor pels anticossos de l'organisme en les febres reumàtiques.
- Efectes provocats per toxines produïdes pels bacteris. Aquestes substàncies resulten tòxiques en alguns teixits. Les toxines són en general específiques de cada espècie; per exemple, la toxina responsable de la diftèria és diferent de la responsable del còlera.

ANTIBIÒTICS

1.-Definició

Un antibiòtic és qualsevol compost químic, natural o artificial, amb la capacitat d'eliminar o inhibir el creixement o la reproducció d'alguns microorganismes i evitar la progressió d'un procés infecciós.

Una propietat comuna en els antibiòtics és la toxicitat selectiva: es tracta que la toxicitat cap a altres organismes invasors és superior a la toxicitat davant als animals o éssers humans.

En un principi, el terme antibiòtic només era utilitzat per a referir-se als compostos orgànics produïts per bacteris o fongs que eren tòxics per altres microorganismes, però avui dia també és utilitzat per a anomenar els compostos sintètics o semisintètics. Tot i això, als antibiòtics, els podem trobar en diferents categories: els fàrmacs antipalúdics, antivírics, antiprotozoos i els antibacterians, la principal categoria i la que estudiarem en aquest treball.

2.-Fets històrics

Els mecanismes d'acció dels antibiòtics no ha estat conegut, de forma científica, fins el segle XX, però la utilització de compostos orgànics per al tractament d'infeccions es coneix des de l'antiguitat.

La primera observació del que avui dia podem anomenar efecte antibiòtic va ser realitzada pel químic francès Louis Pasteur, que va descobrir que alguns bacteris sapròfits podien destruir gèrmens antex.

Posteriorment, el fet més important fou el 1928, quan Fleming va ser requerit pel Consell d'Investigació Mèdica per a contribuir en un llibre titulat *Un sistema de Bacteriologia*, on havia d'escriure un article sobre estafilococs. Preparant aquest article decidí examinar un gran nombre de plaques de cultiu on creixien aquests microorganismes. Varen ser destapades per poder-les examinar, així que entraren en contacte amb l'aire. Posteriorment les va deixar sobre el prestatge,

com ja era habitual en ell. Generalment era una molèstia, però, gràcies a això, un dia tragué les tapes d'algunes de les plaques i trobà, com ja era habitual, que estaven contaminades per floridures. Però la seva sorpresa fou trobar que un creixement d'estafilococs s'havia detingut al voltant d'un tipus especial de floridura on no s'havien format gaires grans de colònies, sinó que semblaven petites gotes. Fleming va prendre una part d'aquesta floridura i la guardà en un tub de brou. Aquest fet, gràcies a l'atzar, ja que en aquells moments Fleming no estudiava les propietats antibacterianes de les floridures, conduí al descobriment de la penicil·lina. Després d'aquests fet, va dissenyar diversos experiments per a examinar les propietats de les floridures que havia fet créixer en un cultiu on va inocular diversos tipus de bacteris en formes radials des de la floridura, situada al centre. D'aquest experiment es tragueren molt bones observacions, ja que Fleming observà que precisament els microorganismes patògens per a l'home eren els que havien vist més inhibir el creixement. Oposadament a l'efecte de la lisozima, substància que produïa la mort a bacteris innocus a l'home, també descoberta per Fleming (1920).

Fleming es documentà per poder identificar la floridura, fins arribar a la conclusió que es tractava de *Penicillium* del gènere *Crisogenum*, el qual, dos anys més, tard va ser identificat com a *Penicillium notatum*, descobert anteriorment en alguns isòtops descomposts. Aquest fet ens porta a una petita anècdota i a un antecedent sobre les propietats antibacterianes, ja que Fleming recordà que David, al Salm 51, havia pregat "Ruixeu-me, doncs, amb hisop i quedaré net."

El pas següent fou cultivar la floridura en brou, cosa que al principi no va ser gaire fàcil. La filtrà i va realitzar assaigs per veure si el brou exercia efecte sobre els bacteris. Això ho realitzà afegint el líquid a diversos cultius bacterians on va poder observar que contenia un ingredient actiu que inhibia notablement el creixement de molts tipus de bacteris. Va decidir anomenar-la "penicil·lina". Seguidament realitzà diferents experiments per descobrir si produïa efectes secundaris però no fou així: els experiments van mostrar que la potent substància antibacteriana no perjudicava les cèl·lules dels teixits. Per tant, al 9 de gener de 1929 va tractar amb penicil·lina el seu ajudant, que patia de sinusitis. Utilitzà un cultiu on veié que la substància havia matat part dels bacteris amb una forma altament diluïda de penicil·lina. Tot i això, fins que pogués ser injectada al corrent sanguini de l'home hauria de ser separada del brou i purificada. Aquests procés s'intentà amb l'evaporació al buit, però el que pogué aconseguir fou un dipòsit espès que contenia la penicil·lina concentrada molt inestable. Intentà cercar ajuda per dur a terme la purificació, però el treball de Fleming no proporcionava prou entusiasme, i no n'obtingué.

Fins al tercer Congrés de Microbiologia no havien sorgit interessos pel treball de Fleming, però va ser allà on va veure que el seu treball era seguit a Amèrica, i hi sorgien diversos interessos per la lisozima, la qual ja era treballada pel Dr. Howard Florey. Fou Florey qui introduí i interessa Chain per les substàncies antibacterianes, el qual ràpidament s'interessarà per la penicil·lina. Ell fou qui, posteriorment, obtingué veritablement la substància pura.

Fou el 1938 quan inicià la seva investigació, juntament amb Florey, sobre la penicil·lina. Chain va assumir aïllar un extracte purificat de floridura crua de Fleming, mentre que Florey n'estudià les propietats biològiques. En aquells moments, el procés de liofilització s'havia desenvolupat molt, així que va combatre el brou filtrat a aquesta tècnica i va obtenir una pols marró que contenia penicil·lina amb impureses. Havia de separar les impureses. Per tant, ho intentà amb alcohol etílic pur, però no ho aconseguí. Posteriorment ho intentà amb l'alcohol metílic i obtingué una petita quantitat de penicil·lina parcialment purificada. Chain, amb ajut d'un col·laborador, va aconseguir una posterior purificació i varen assajar-ne l'efectivitat col·locant-la en plaques de cultiu adjacents a colònies de bacteris. Aquests experiments mostraren que el producte parcialment purificat era mil vegades més actiu que la penicil·lina en cru. Però posteriorment fou purificada al complet, i es demostrà que era un miler de vegades més potent que la primera substància de Fleming. A partir d'aquí, es dissenyaren diferents experiments. Un fou l'1 de juliol de 1940 on s'injectaren un gran nombre d'estreptococs a cinquanta ratolins blancs. A la meitat se'ls va injectar penicil·lina cada tres hores durant un període de quaranta-vuit hores, mentre que la resta va quedar com a grup control. El resultat fou excel·lent. Els vint-i-cinc components del grup control varen morir en setze hores, però vint-i-quatre dels vint-i-cinc tractats amb penicil·lina van sobreviure. Havia arribat el moment d'injectar la droga al corrent sanguini d'un ésser humà. El febrer de 1941, un policia

d'Oxford va entrar a l'hospital greument malalt de septicèmia per estafilococs, microorganismes que en condicions de laboratori ja havien mostrat ser sensibles a la penicil·lina. Al policia se l'hi havia infectat una petita nafra del llavi per on els estafilococs havien penetrat al corrent sanguini. El cas era desesperat. Les sulfamides havien resultat ineficaces, i l'home estava acabat. Així que el 12 de febrer de 1941 es convertí en el primer pacient que rebria penicil·lina en sang. En 24 hores la millora va ser notable, ja que els microorganismes havien estat reduïts. Se li va fer una transfusió de sang per ajudar-lo a augmentar la resistència, i se li va subministrar una mica més de penicil·lina, fins que aquesta es va esgotar. Finalment l'home morí a causa del poc subministrament de penicil·lina que hi havia. Florey es dirigí a diferents industrials químics, ja que després d'aquell fet, amb tant èxit i alhora decebedor, necessitaven suport comercial. En aquell moment no hi havia ningú disposat, així que prengueren l'alternativa de sol·licitar ajuda americana, cap on es varen dirigir amb soques de floridura penicil·lina.

El 1944 Fleming i Florey rebren el títol de Sir i un any més tard van compartir amb Chain el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina.

La benzè-penicil·lina, que es produeix per l'addició d'àcid fenilacètic al medi en què es cultiva la floridura de penicil·lina, continua essent avui dia, tot i haver descobert molts antibiòtics, el millor contra molt soques de *Staphylococcus aureus* i en el tractament de les infeccions per *Streptococcus pyogenes*, pneumònies, meningitis, sífilis, gonorrea gasosa, àntrax, etc. Fou una gran sort que mai no fos injectada a conills d'indies, ja que s'ha demostrat més tard que produeix un efecte letal en aquest animal. Què seria avui dia de la penicil·lina si Florey o Chain haguessin experimentat amb conills d'indies? Això sí, gràcies a la substància original ha estat possible obtenir moltes més substàncies antibiòtiques cada una amb un lloc específic en el tractament de les malalties infeccioses.

3-Producció d'un antibiòtic (visió general).

El procés d'elaboració d'un antibiòtic és llarg i costós. Primer s'ha d'identificar l'organisme productor de l'antibiòtic; i l'antibiòtic s'ha de provar davant d'una gran varietat d'espècies bacterianes. A continuació, el microorganisme s'ha de cultivar a gran escala per a permetre'n la purificació i l'anàlisi química i poder-lo diferenciar d'altres antibiòtics. Tot aquest procés és molt complex perquè hi ha milers de compostos amb activitat antibacteriana, els quals són redescoberts de manera cíclica. Un cop l'antibiòtic ha demostrat l'eficàcia en el tractament d'infeccions en animals, ja es pot començar a preparar a gran escala.

Es fa una intensa feina d'investigació per poder augmentar la productivitat seleccionant soques millorades del microorganisme o combinant el medi de cultiu. És en aquest moment quan es cultiva el microorganisme en grans alfàbies d'acer amb sistemes de ventilació. Gràcies a aquesta ventilació el producte fermenta naturalment, i posteriorment es pot modificar químicament per produir antibiòtics semisintètics. Després del procés de purificació, l'activitat antibiòtica, és a dir, l'efecte de l'antibiòtic en els òrgans i teixits de l'hoste, i els possibles efectes tòxics, han de ser analitzats en un gran nombre d'animals de diferents espècies. A més a més, s'han de determinar les formes i les quantitats d'administració més efectives i adequades.

Un cop completat aquest procés, segons els països, el productor sol·licita un assaig clínic a l'agència de control de medicaments. Si la sol·licitud és aprovada, aquest control es divideix en diferents fases experimentals.

Si les fases experimentals són satisfactòries es sol·licita a l'agència de control de medicaments que sigui inclòs com a nou fàrmac. S'ha d'obtenir, també, una autorització comercial per a la utilització generalitzada del medicament en la pràctica mèdica.

Tot aquest procés, que va des del descobriment de l'antibiòtic en el laboratori fins a l'assaig clínic, es pot allargar diversos anys.

4.- Aspectes generals dels antibiòtics

4.1. ACTIVITAT I ESPECTRE D'ACCIO DELS ANTIOTIOTICS:

L'activitat bacteriana pot ser de dos tipus:

- Activitat bacterioestàtica: l'antibiòtic inhibeix el creixement dels bacteris.
- Activitat bactericida: l'antibiòtic produeix la mort dels bacteris.

L'espectre d'acció:

- Espectre curt: l'efecte és sobre un nombre reduït d'espècies bacterianes.
- Espectre ampli: l'efecte és sobre un gran nombre d'espècies bacterianes.

4.2. MECANISME D'ACCIO DELS ANTIBIOTICS

La principal característica és que l'antibiòtic no ha de ser tòxic, i perquè això succeeixi ha d'actuar sobre molècules que siguin presents els bacteris.

Els punts d'acció d'un antibiòtic poden ser cinc:

1.-Paret cel·lular: l'efecte tòxic en aquest cas serà molt poc perquè la cèl·lula eucariota humana no sintetitza peptidoglicans, ja que no té paret cel·lular.

Els antibiòtics més emprats per a interferir amb la síntesi de peptidoglicà són els antibiòtics BETALACTÀMICS, que depenen de la seva estructura química. Es poden classificar en PENICIL·LINES, CEFALOSPORINES, CARBAPENEMES I MONOBACTAMES. Tots els antibiòtics betalactàmics comparteixen una estructura química similar en forma d'anell. Aquest anell impedeix la unió dels pèptids a les cadenes laterals en el procés de formació de la paret cel·lular. Tots aquests compostos inhibeixen la síntesi de peptidoglicà però no interfereixen amb la síntesi de components intracel·lulars; per tant, en l'interior de la cèl·lula es continuen formant materials que augmenten la pressió sobre la membrana fins que acaba cedint, i el material cel·lular s'allibera a l'exterior, i mor el bacteri.

2.-Membrana cel·lular: l'efecte és tòxic perquè es destrueix la membrana cel·lular. En aquest cas els antibiòtics més emprats són les POLINIXINES (bactericides de curt espectre). Són detergents i tenen una regió hidròfila i una regió hidròfoba que distorsiona la membrana.

3.-Síntesi proteica: Apareixen quatre grups d'antibiòtics.

- MACROLIDS (bacterioestàtics de curt espectre). Afecten grampositius. Interaccionen amb la subunitat 50s del ribosoma i bloquen la translocació del pèptid que s'està sintetitzant.
- AMINOGLICÒSIDS (bactericides d'ampli espectre). Actuen interaccionant amb les subunitats 30s, 50s i inhibeixen i disminueixen el nucli de la síntesi proteica.
- TETRACICLINES: (bacterioestàtics d'ampli espectre). Actuen també sobre subunitats 30s i disminueixen la unió de l'aminoacil-ARNt
- CLORAMFENICOL (bacterioestàtic d'ampli espectre). Actua sobre subunitats 50s i disminueix el procés de transpeptidocció (formació de l'enllaç peptídic entre la proteïna en formació i un nou aminoàcid).

4.-Inhibició del metabolisme intermediari: Mecanisme d'acció dut a terme per les SULFAMIDES (ampli espectre i bacterioestàtic). Inhibeix per competició la dihidroperooat sintetasa, i produeix una disminució d'àcid fòlic. Els bacteris han de sintetitzar àcid fòlic perquè hi són impermeables. L'àcid fòlic no es pot formar en l'home. Per tant, el pren preformat. Això causa que l'efecte tòxic sigui molt petit

Els TRIMETOPRIM (bactericides d'ampli espectre) també prenen part del procés d'inhibició del metabolisme intermediari. Inhibeixen la dihidrofolat reductasa bacteriana, i produeixen una disminució d'àcid tetrahidrofòlic (és el nucli de les purines, pirimidines i de certs aminoàcids; sense ell la cèl·lula no pot continuar creixent i mor).

5.- La inhibició de la síntesi d'àcids nucleics és duta a terme per:

- QUINOLONES (bactericides d'ampli espectre) Disminueixen dos enzims com la DNAGirasa i la topoisomerasa IV, que actuen en la rèplica i transcripció de l'ADN.
- RIFAMICINA (bacterioestàtics de curt espectre). Actua disminuint la RNAPolimerasa.

INFORME DE LA PRÀCTICA: ANTIBIOGRAMA

Objectius

Classificar les nostres soques en les tres classes definides: sensible (S), intermèdia (I) i resistent(R) davant certs tipus d'antibiòtics definits.

Material

- Les tres soques: E. coli, S. aureus, P.aeruginosa.
- Discs antibiòtics: Cefazolina (KF), Seprin(SXT)
- Plaques de petri amb agar Mueller-Hinton.
- Escovilló de sembratge
- Dispensador dels disc d'antibiòtic
- Estufa d'incubació
- Refrigerador

Procediment

- 1.-Agafem un escovilló estèril i el submergim en la suspensió de la soca.
- 2.-Sembrem amb l'escovilló en una placa de petri amb agar, passant l'escovilló per la superfície del medi de cultiu tres vegades rotant 60° graus la placa, tot passant-la finalment per la perifèria per tal d'aconseguir un sembratge uniforme.
- 3.-Deixem assecar les plaques de 3 a 5 min, però no més de 15 min. abans de col·locar els discs.
- 4.-Agafem el dispensador amb els discs d'antibiòtics i el posem, pressionant lleugerament la superfície de la placa perquè quedin ben posats els discs
- 5.-Deixem la placa a temperatura ambient per tal que l'aigua que hi ha en el medi Mueller-Hinton difongui els antibiòtics d'una manera gradual, de forma circular, de més a menys concentració.
- 6.- Col·loquem les plaques sembrades i amb els discs a l'estufa d'incubació a 35° C (les col·loquem amb grup i invertides).

Resultats

A primera vista es pot observar com les soques han tingut un creixement excepte al voltant de certs antibiòtics.

- E.Coli (mesura del CIM en mm)

ANTIBIÒTIC	DIÀMETRE D'INHIBICIÓ
Ampicilina (AMP)	14mm(-)
Gentamicina (CN)	22mm
Cefotaxina (CTX)	30mm
Piperacilina (PRL)	28mm(+)
Cefazolina (KF)	18mm(-)
Sulfamides (S3)	26mm(+)
Seprín (SXT)	29mm

(+): L'halo d'inhibició és major al del patró.

(-): L'halo d'inhibició és menor al del patró

- S. aureus (mesura del CIM en mm)

ANTIBIÒTIC	DIÀMETRE D'INHIBICIÓ
Amoxicilina (AM)	29mm(+)
Oxacilina (OX)	22mm
Cefazolina (KF)	35mm
Ciprofloxacina (CIP)	-
Vancomicina (VA)	18mm
Seprín (SXT)	33mm

(+): L'halo d'inhibició és major que el del patró.

Com es pot observar en les taules, majoritàriament el creixement ha estat l'estàndard segons el patró, però també han hagut excepcions.

Conclusions

- Escherichia coli: A partir dels resultats obtingut en la pràctica i comparant-los amb el patró teòric, tot i no coincidir amb els valors d'aquest, podem determinar que el bacteri E.coli és sensible,

en gran part, a tots als antibiòtics utilitzats en el creixement, ja que l'halo d'inhibició és considerablement gran.

Per tant, concloem que *E. coli* ATCC 25922 és un bacteri considerat SENSIBLE respecte a aquests antibiòtics.

- *P. aeruginosa*: En aquest bacteri, l'antibiograma ens mostra que és sensible a la GENTAMICINA, CEFOTAXINA i PIPERACILINA, formant un halo d'inhibició considerable. Davant els altres antibiòtics, aquest bacteri presenta una resistència màxima, ja que ha inhibit l'antibiòtic.

Per tant la soca *P. aeruginosa* ATCC 27853, és SENSIBLE davant dels antibiòtics referits en les línies anteriors. Així doncs, la considerem RESISTENT a la resta d'antibiòtics utilitzats a la pràctica.

- *S. aureus*: En l'observació d'aquests resultats, podem extreure que aquest bacteri presenta una sensibilitat enfront de tots els antibiòtics utilitzats, excepte la CIPROFLOXACINA, davant la qual presenta una resistència total, ja que ha inhibit l'antibiòtic. En comparació amb el patró, tots els resultats ha coincidint, menys l'obtingut amb l' AMOXICILINA.

Per tant, concloem que aquest bacteri és RESISTENT a la CIPROFLOXACINA i SENSIBLE a la resta d'antibiòtics utilitzats.

A més a més, els resultats observables respecte als dos antibiòtics presents en les tres plaques (CEFAZOLINA i SEPTRIN) i el creixement bacterià coincideix amb l'espectre d'acció l'antibiòtic (informació teòrica), després d'haver fet una petita comparació entre conclusions i la informació sobre l'espectre d'acció d'aquests antibiòtics.