

# La lluita bacteriana per la supervivència



Febrer de 2015

# AGRAÏMENTS

*Gràcies a la meva tutora, Montserrat Herbera Ribas, per la seva dedicació, el seu suport, la seva supervisió atenta al meu treball, els mitjans que m'ha proporcionat i, en definitiva, l'ajuda àmplia i rigorosa sense la qual aquest treball no hagués estat possible.*

*Gràcies també al Dr. Joaquim Ruiz Blazquez per concedir-me una entrevista i ensenyar-me el funcionament del laboratori del Centre de Recerca de Salut Internacional de Barcelona (CRESIB).*

*Per últim, vull expressar el meu agraïment a la Fina Figuerola pel seu suport, i a la meva família per la seva paciència i per estar sempre al meu costat.*

# ÍNDEX

INTRODUCCIÓ .....	4
PART TEÒRICA.....	6
1. Els Bacteris.....	6
1.1. Què són?.....	6
1.2. Estructura bacteriana.....	6
1.3. Morfologia bacteriana .....	10
1.4. Reproducció dels bacteris .....	11
1.5. Transformació bacteriana.....	13
1.5.1.Plasmidi pGLO.....	14
1.6. Regulació de l'expressió genètica .....	15
1.6.1. Operó arabinosa .....	16
1.7. <i>Aequorea victoria</i> .....	17
1.8. Metabolisme bacterià.....	17
1.9. Relació dels bacteris amb l'hoste .....	18
1.10. <i>Escherichia coli</i> .....	19
1.11. Mètodes de cultiu .....	20
1.11.1. Creixement bacterià en un medi de cultiu .....	21
2. Els antibiòtics.....	21
2.1. Què són?.....	21
2.2. Mecanismes d'acció.....	22
2.3. Famílies d'antibiòtics.....	24
2.4. Descobriment i evolució dels antibiòtics .....	27
3. Resistència dels bacteris als antibiòtics .....	28

3.1. Què és la resistència als antibiòtics? .....	28
3.2. Mecanismes de resistència .....	29
3.3. Agents antibacterians: una nova amenaça .....	33
3.4. Malalties resistents.....	33
3.5. El perill de les granges .....	35
3.6. Què cal fer per prevenir?.....	36
3.7. Antibiograma.....	37
3.7.1. Antibiótics per l'antibiograma .....	37
PART PRÀCTICA.....	38
1. Objectiu de la investigació.....	38
2. Hipòtesi .....	38
3. Material.....	39
4. Procediment.....	40
5. Resultats i discussió dels resultats.....	40
5.1. Experiment 1: antibiograma .....	40
5.2. Experiment 2: lamarckisme .....	42
5.3. Experiment 3: transformació bacteriana .....	44
6. Conclusions .....	45
CONCLUSIÓ GENERAL .....	47
BIBLIOGRAFIA.....	49
ANNEXOS.....	1

# INTRODUCCIÓ

Aquest treball de recerca tracta sobre les resistències dels bacteris als antibiòtics. Els motius que m'han fet triar aquest tema són, en primer lloc, la seva actualitat i la repercussió que té en l'àmbit sanitari. En segon lloc, perquè m'agradaria estudiar biomedicina i aquest treball és una oportunitat per comprovar si realment vaig ben encaminada en relació als meus interessos futurs.

La resistència bacteriana és la capacitat d'alguns bacteris de sobreviure davant d'un o més antibiòtics. Actualment el percentatge de resistències està augmentant arreu del món i, com a conseqüència, es posen en perill tots els avenços de la medicina moderna; fins al punt que els antibiòtics poden deixar de ser efectius i entrar en una etapa en la qual infeccions menors produeixen la mort.

L'ús abusiu de medicaments antibacterians és la causa principal de l'augment de la resistència bacteriana. Durant els darrers 70 anys, la teràpia antibiòtica ha estat un pilar fonamental en el tractament de les malalties infeccioses bacterianes. Però l'ús generalitzat d'aquests medicaments pels professionals de la salut i de la indústria ramadera, ha produït un augment global alarmant de la prevalença de les infeccions bacterianes resistents als antibiòtics.

El treball es divideix en dos grans blocs:

En la primera part aprofundeixo en els coneixements teòrics sobre els bacteris, els antibiòtics i en especial les resistències bacterianes, que representen la part central del treball. S'inclouen dades del consum d'antibiòtics i les resistències actuals i també s'expliquen els mecanismes pels quals s'ha arribat a aquestes resistències. Aquest primer estudi és necessari per dur a terme la segona part del treball, que és la part experimental, realitzada al laboratori de l'Institut seguint el mètode científic.

L'objectiu de la investigació és estudiar com els bacteris adopten les resistències als antibiòtics. El que vull esbrinar és si els antibiòtics presents en el medi provoquen les resistències (idea lamarckiana) o bé aquestes poden ser adquirides gràcies a la introducció d'un gen de resistència, independentment de la presència d'antibiòtic en el medi, proporcionant-los variabilitat (idea neodarwinista). Per això, he plantejat tres experiments; en primer lloc, he dut a terme un antibiograma per tal de trobar un antibiòtic al qual una soca d'*Escherichia coli* fos sensible. En segon lloc, he cultivat la mateixa soca en una concentració d'ampicil·lina, antibiòtic al qual ha resultat sensible, per sota de la mínima inhibidora i, després, he augmentat la concentració amb la finalitat de comprovar si s'han tornat resistents. Finalment, he realitzat una transformació bacteriana amb l'objectiu de convertir una soca sensible en resistent. Aquests dos últims experiments són els que m'han servit per determinar si la presència d'antibiòtic en el medi provoca la resistència o bé si selecciona els bacteris resistents.

A més del seu objectiu principal, aquest treball també pretén sensibilitzar-nos sobre la necessitat de fer un bon ús dels antibiòtics.

Les principals fonts d'informació les he obtingut de la biblioteca de la Facultat de Farmàcia i d'articles publicats en diferents revistes científiques. Això m'ha suposat algunes dificultats a l'hora d'entendre els diferents escrits, ja que anaven dirigits a lectors més especialitzats i gran part de la informació era nova per a mi.

# PART TEÒRICA

En aquesta part s'explicaran aquells aspectes dels bacteris que estan directament relacionats amb el treball. El coneixement d'aquests aspectes facilitarà la comprensió de la recerca.

## 1. Els Bacteris

### 1.1. Què són?

Els bacteris són microorganismes procariotes, unicel·lulars, que poden trobar-se aïllats o formant colònies. Abunden en superfícies inanimades i en les parts del cos en contacte amb l'exterior, la pell i les mucoses. En el cos humà el nombre de cèl·lules bacterianes és aproximadament deu vegades el nombre de cèl·lules humanes. La majoria viuen sense perjudicar-nos. De fet, alguns ens protegeixen de malalties ja que competeixen amb els bacteris patògens. Són d'estructura simple, no presenten nucli, però sí material genètic (DNA) lliure pel citoplasma, en concret en una zona anomenada nucleoide.

Els bacteris es diferencien dels animals i de les plantes per la seva ràpida multiplicació i pel seu metabolisme, a més del tipus de cèl·lula. Constitueixen un grup important per a l'equilibri del món vivent ja que són essencials en els ecosistemes.

La seva mida oscil·la entre 0.5 i 3  $\mu\text{m}$ , tot i que alguns poden arribar a 10  $\mu\text{m}$ .

### 1.2. Estructura bacteriana

Podem dividir les diferents estructures bacterianes segons si són vitals per a ells o no.

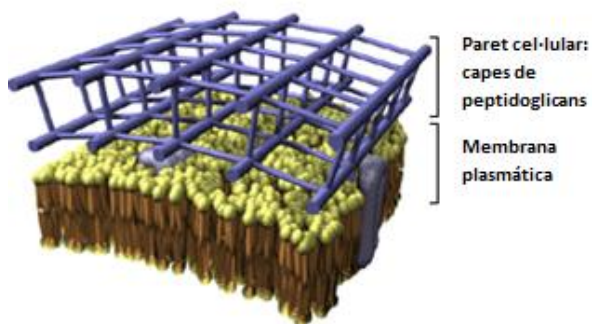
Dins de les estructures presents a tots els bacteris trobem:

- **Paret bacteriana:** és una coberta rígida que dona forma als bacteris i els protegeix de la pressió osmòtica. La paret pot protegir a la cèl·lula de substàncies tòxiques i és el lloc d'acció d'alguns antibiòtics.

Segons la seva paret, els bacteris es divideixen en dos grans grups: **grampositius i gramnegatius**. La distinció es fa gràcies a un tipus de tinció anomenada Tinció de Gram que consisteix en tenyir els bacteris amb el

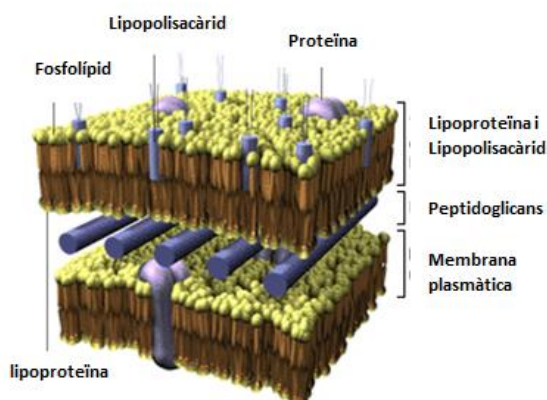
colorant cristall violeta de manera que quedin de color blau. A continuació s'hi afegeix el reactiu lugol que produeix la impermeabilització a l'alcohol als bacteris grampositius. Després s'hi afegeix alcohol i a causa de la capa impermeable dels grampositius, només es decoloren els gramnegatius. Finalment s'hi afegeix el colorant safranina, que només tenyeix de vermell els bacteris gramnegatius prèviament decolorats. Per tant, els bacteris grampositius queden de color blau i els gramnegatius de color vermell.

La paret cel·lular dels grampositius és més gruixuda i d'aspecte llis. El 90% de la paret està formada per peptidoglicans (polímer format per monosacàrids i aminoàcids) especialment de mureïna i per petites quantitats d'àcid teicoic. Pel fet de tenir una capa gruixuda de peptidoglicans aquests bacteris són molt sensibles a l'acció de la penicil·lina o derivats i a l'acció del lisozim, que és un enzim present en les llàgrimes i les secrecions nasals que té acció bactericida.



**FIG. 1:** Paret bacteriana grampositiva.

La paret cel·lular dels gramnegatius és més complexa. Només el 10% de la paret està formada per una capa fina de peptidoglicans sobre la qual hi ha una membrana externa constituïda per una doble capa lipídica que conté un gran nombre de proteïnes i lipopolisacàrids. Entre les dues capes es troba l'espai periplàsmic, d'una gran activitat metabòlica.



**FIG. 2:** Paret bacteriana gramnegativa.

- **Membrana plasmàtica:** és una coberta que separa l'interior de l'exterior cel·lular. És molt semblant a la membrana de les cèl·lules eucariotes però a diferència d'aquestes no conté colesterol. Consisteix en una bicapa proteica i lipídica a causa del caràcter amfipàtic dels lípids que la formen. Presenta unes invaginacions que formen unes vesícules anomenades mesosomes que contenen enzims que intervenen en la duplicació del DNA, entre altres funcions. Les funcions de la membrana són delimitar el bacteri, regular el pas de substàncies i dur a terme activitat enzimàtica (dirigir la duplicació del DNA, fer la respiració bacteriana, etc.).
- **El citoplasma:** inclou el citosol i els orgànuls cel·lulars. A l'interior, les cèl·lules procariotes són molt més senzilles que les eucariotes. En general només presenten ribosomes, que es troben lliures pel citoplasma o formant cadenes anomenades poliribosomes. La funció dels ribosomes és la síntesi de proteïnes. També poden presentar inclusions, que són grànuls de substància de reserva sintetitzada pel bacteri en moments d'abundància.
- **Cromosoma bacterià:** està format per una doble cadena de DNA circular que es troba lliure pel citoplasma en una regió anomenada nucleoide. El DNA bacterià es troba superenrotllat i associat a proteïnes. Conté la informació genètica del bacteri i per això la seva funció és dirigir tot el metabolisme bacterià.

Els bacteris també poden presentar una sèrie d'estructures que no són necessàriament presents en tots ells:

- **Plasmidis:** són molècules circulars i de doble cadena de DNA que constitueixen una unitat de replicació independent del cromosoma. Podem trobar més d'una còpia del mateix plasmidi i també diferents plasmidis dins d'un mateix bacteri.

Tot i que el DNA del plasmidi no porta informació essencial per a la vida del bacteri, pot portar gens que són útils per a l'adaptació en diferents ambients.

Molts bacteris patògens per a l'home, només ho són quan porten un plasmidi que conté gens específics que li permeten sintetitzar substàncies

tòxiques o formar molècules d'adhesió a teixits. D'altra banda, hi ha plasmidis que contenen gens de resistència a antibiòtics i entre els bacteris, fins i tot de diferents espècies, es poden passar la informació genètica fent que bacteris sensibles a un antibiòtic es tornin resistents. Aquesta transferència es fa a través dels pèls sexuals i només passen una cadena del plasmidi a l'altre bacteri.

En aquest treball de recerca s'emprarà un plasmidi per transferir la resistència bacteriana a l'ampicil·lina a una soca sensible a aquesta.

- **Pèls:** són estructures allargades i buides.

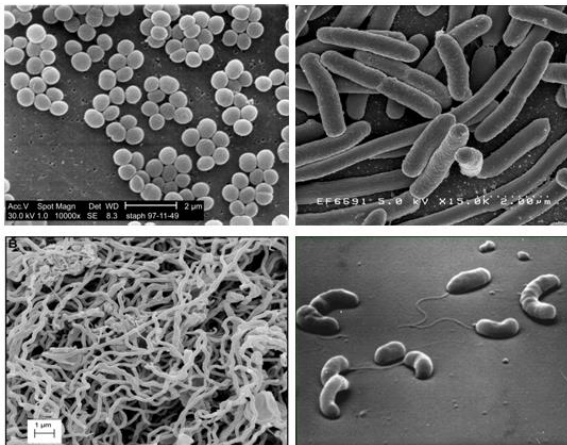
Diferenciem dos tipus de pèls: els pèls sexuals, més llargs i presents en bacteris que tenen plasmidis per passar-se el material genètic; i els pèls d'unió (fimbries), més curts, per adherir-se a diferents superfícies.

- **Flagels:** són prolongacions primes, de longitud i diàmetre uniforme, responsables de la mobilitat bacteriana.
- **Càpsula:** és una estructura que apareix en alguns bacteris, formada per polisacàrids. La càpsula protegeix el bacteri de la fagocitosi i d'anticossos del sistema immunitari, de la dessecació i ajuda a la fixació a cèl·lules hostes.
- **Altres orgànuls:** alguns bacteris presenten orgànuls delimitats per membranes rígides formades per proteïnes. Els principals tipus són: **vacúols de gas**, contenen aire i actuen com a flotadors del bacteri; **clorosomes**, contenen pigments fotosintètics; **carboxisomes**, contenen un enzim responsable de la fixació del CO<sub>2</sub> de l'aire.

### 1.3. Morfologia bacteriana

Hi ha quatre tipus morfològics de bacteris:

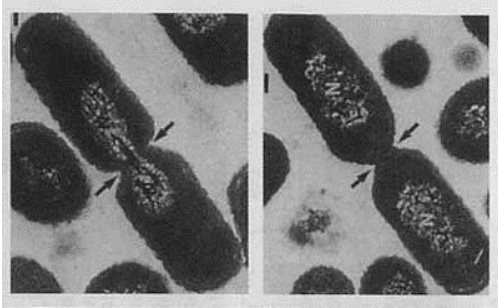
- **Cocs:** de forma esfèrica. Tenen la capacitat de viure com a cèl·lules individuals o enllaçar-se amb altres formant cadenes. És poden dividir en una direcció (estreptococs), en dues direccions (estafilococs) o en tres direccions (sarcines). Són patògens per als humans. Per exemple: *Streptococcus pneumoniae*, causant de la pneumònia.
- **Bacils:** en forma de bastó. Molts bacils són patògens per a l'ésser humà, però també hi ha alguns que no ho són, com els que s'encarreguen de produir alguns làctics com el iogurt (lactobacils). Un exemple de bacil que pot ser patògen és *Escherichia coli*, que acostuma a causar infeccions intestinals.
- **Espirils:** en forma de bastó cargolat. Són més sensibles a les condicions ambientals que els altres bacteris. Poden ser patògens. Com per exemple el causant de la sífilis, *Treponema pallidum*.
- **Vibrions:** en forma de coma ortogràfica. Alguns són patògens per als humans i acostumen a provocar problemes digestius o infectar ferides obertes. El causant del còlera, *Vibrio cholerae*, seria un exemple.



**FIG.3:** Bacteris des del microscopi electrònic.  
Per ordre: cocs, bacils, espirils i vibrions.

## 1.4. Reproducció dels bacteris

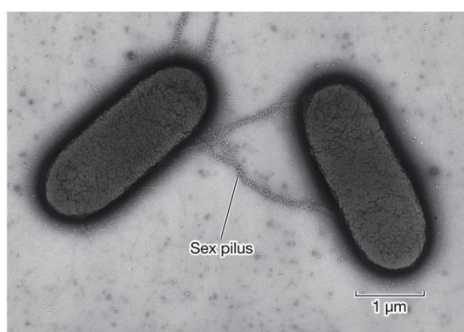
La reproducció bacteriana és asexual, és a dir, no hi ha fecundació i els descendents són clons als progenitors i clònics entre ells. És duu a terme per bipartició; un cop duplicat el DNA es forma un septo que origina dos bacteris fills.



**FIG. 4:** Reproducció asexual en bacteris.

Aquest tipus de reproducció presenta poca variabilitat (només si hi ha mutacions), però els bacteris mitjançant la donació i recepció de DNA aconsegueixen adquirir informació genètica d'un altre bacteri, encara que sigui d'una altra espècie, sense crear descendència. Aquest fenomen s'anomena **parasexualitat bacteriana**. N'existeixen tres tipus:

- **La conjugació:** és la transferència de material genètic entre dos bacteris per contacte directe a través dels pèls sexuals (que són filaments buits). La capacitat de transferir DNA està codificada en el plasmidi, conegut com a factor de transferència. Els bacteris que el posseeixen són els donants i els que no, s'anomenen receptors. Perquè es realitzi la transferència, els pèls sexuals formen un pont entre les dues membranes citoplasmàtiques per on passarà el DNA. El resultat de la conjugació és un bacteri amb les seves característiques inicials i les del bacteri donador.



**FIG. 5:** Conjugació.

- **La transducció:** és la transferència de DNA d'un bacteri a un altre a través d'un virus. La incorporació de DNA bacterià a l'interior de la càpsida d'un virus es produeix a conseqüència d'errors comesos durant el cicle de duplicació del virus. Quan aquest conté gens bacterians, té la capacitat de transferir-los al cromosoma d'un altre bacteri. Hi ha dos tipus de transducció diferents:

**Transducció generalitzada:** és produïda durant el cicle lític (quan el virus trenca el bacteri). Queden fragments del cromosoma bacterià a la càpsida viral, que podran ser transferits a un altre bacteri.

**Transducció especialitzada:** es produeix quan el virus abandona el bacteri de forma errònia. Això fa que el virus s'emporti porcions específiques del genoma bacterià, que podran ser transferides a un altre bacteri.

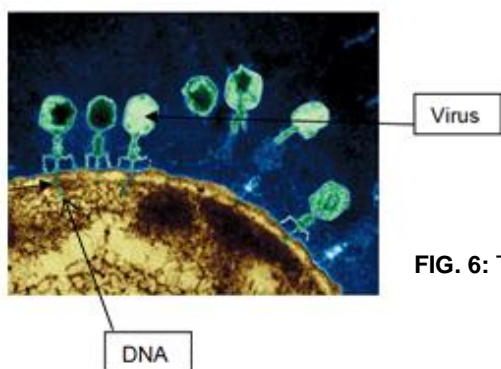


FIG. 6: Transducció.

- **La transformació:** és la captura de DNA lliure en el medi, pot provenir de la ruptura d'un bacteri. El bacteri receptor adquireix els gens del DNA en forma de plasmidi o al cromosoma bacterià.

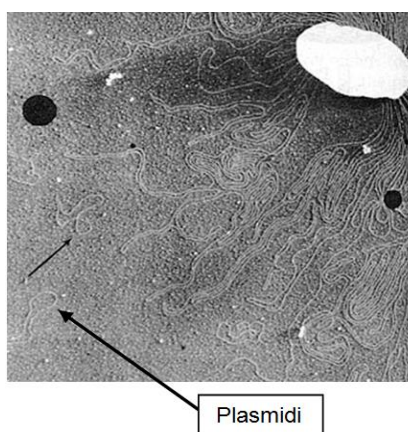


FIG. 7: Transformació: s'ha produït la lisi d'un bacteri (estructura blanca) que ha alliberat plasmidis. Un altre bacteri podrà captar-los.

## 1.5. Transformació bacteriana

A continuació aprofundiré en el fenomen de la transformació bacteriana, ja que n'he realitzat una en aquest treball.

Com he dit anteriorment, la transformació bacteriana és un procés pel qual un bacteri capta DNA lliure en el medi. Perquè la transformació es pugui fer, el bacteri s'ha de trobar en **estat de competència**, és a dir, presentar alteracions a la seva paret i membrana cel·lular, que permetin l'entrada d'àcids nucleics al seu interior.

Al laboratori s'ha aconseguit induir aquest estat de competència en bacteris que no el presenten de forma natural, com és el cas d'*E. coli*. Un dels tractaments químics més utilitzats és mitjançant una solució de clorur de calci ( $\text{CaCl}_2$ ). Els ions  $\text{Ca}^{2+}$  presents a la solució, neutralitzen la repulsió entre les càrregues negatives dels grups fosfats del DNA i els fosfolípids de la membrana cel·lular. A més, formen petits porus a la membrana del bacteri que permeten l'entrada del DNA.

S'incuba en gel la solució de  $\text{CaCl}_2$  amb els bacteris, de forma que disminueix la fluïdesa de la membrana. Tot seguit, es realitza **el xoc tèrmic**: s'introdueix la solució durant 50 segons al bany maria a  $42^\circ\text{C}$ , de manera que augmenta la permeabilitat de la membrana cel·lular i facilita l'entrada del plasmidi dins dels bacteris. Inmediatament, es tornen al gel durant 2 minuts i, finalment, s'incuben durant 10 minuts a temperatura ambient després d'afegir caldo nutritiu que permet el creixement de les cèl·lules i l'expressió del gen d'interès.

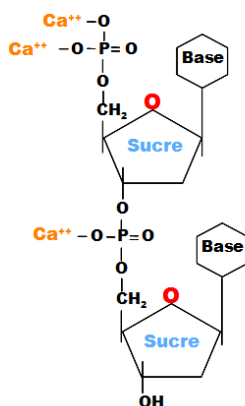


FIG. 8: Neutralització de la càrrega negativa del DNA.

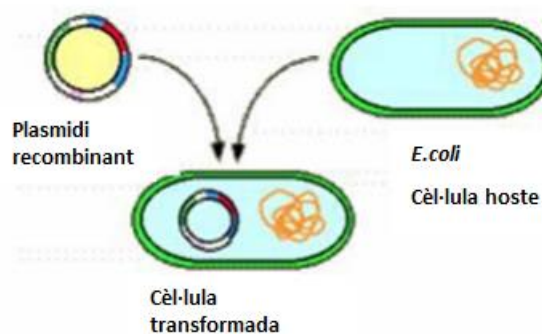
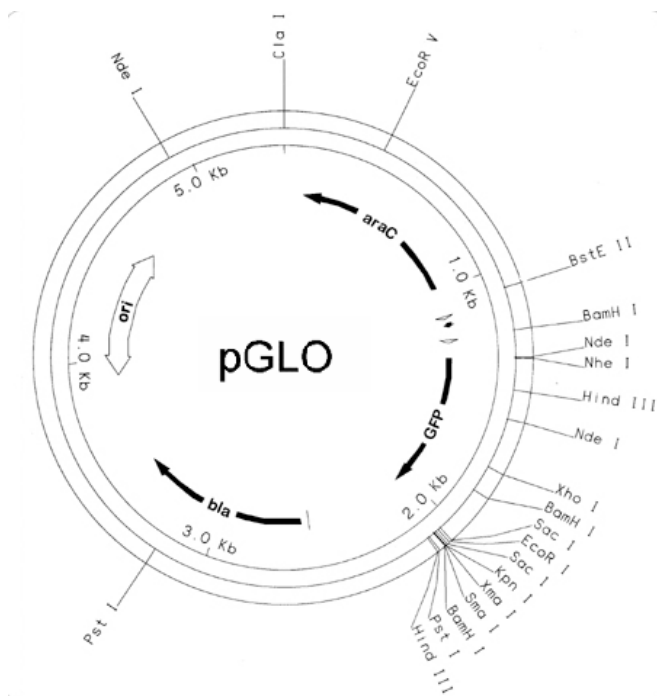


FIG. 9: Esquema simplificat d'una transformació bacteriana.

### 1.5.1. Plasmidi pGLO

El vector que he emprat per a la transformació bacteriana en el meu treball de recerca és el plasmidi pGLO. Com tots els plasmidis, és d'estructura circular i s'expressen diversos gens, dels quals destaquem:

- **Lactamasa beta (bla):** gen que codifica per a la producció de  $\beta$ -lactamasas, un enzim que trenca l'anell  $\beta$ -lactàmic present en les penicil·lines, cosa que farà que els bacteris presentin resistència a l'ampicil·lina.
- **GFP (Green Fluorescent Protein):** gen provinent de la medusa *Aequorea victoria*, de què parlaré més endavant. El gen GFP proporcionarà bioluminescència als bacteris, les colònies presentaran color verd al ser il·luminades amb llum UV i per tant, ens permetrà comprovar que la resistència a l'ampicil·lina la dóna l'adquisició del plasmidi i no un altre factor.
- **Regulador (araC):** gen que codifica per a la proteïna araC que regula la transcripció de la GFP. A continuació, aprofundeixo en la importància d'aquest gen per a la transformació.



**FIG. 10:** Esquema del plasmidi pGLO amb els principals gens marcats a l'interior.

## 1.6. Regulació de l'expressió genètica

Les cèl·lules no estan constantment sintetitzant tots els tipus de proteïnes sobre les quals tenen informació. Si fos així es produiria un caos en el seu metabolisme. Per això existeix un sistema de regulació: com que la quantitat de proteïnes sintetitzades és directament proporcional a la quantitat de mRNA (RNA missatger) present al citoplasma, el que regula els nivells de proteïnes del medi és el RNA sintetitzat. Aquest depèn, en les procariotes, del substrat disponible.

En els bacteris es va descobrir el **model de l'operó**, que explica com s'efectua el control de la síntesi proteica. L'operó és un segment de DNA format per un grup de gens estructurals que estan controlats per altres gens: l'operador, el promotor i un gen regulador. **L'operador** regula l'accés de l'RNA polimerasa al **promotor**, on s'inicia la transcripció. **El gen regulador** codifica per a proteïnes, anomenades repressores, que s'uneixen a l'**operador** i impedeixen la transcripció dels **gens estructurals**. Però en funció dels substrat present a la cèl·lula, s'inactiva la proteïna repressora, l'operador queda lliure i és desencadena la transcripció dels gens estructurals sintetitzant la proteïna d'interès.

**L'operó lac** per exemple, present a *E. coli*, funciona de la següent manera:

Si hi ha lactosa al medi, aquesta s'uneix a la proteïna repressora i la inactiva. L'operador queda lliure i desencadena la transcripció dels gens estructurals, sintetitzant-se els enzims necessaris per a metabolitzar la lactosa. Quan no hi ha lactosa al medi el repressor torna al seu estat actiu i deixen de transcriure's els gens estructurals.

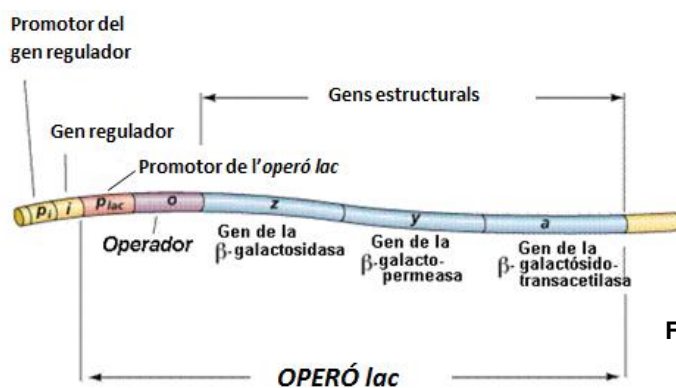


FIG. 11: Operó lac.

### 1.6.1. Operó arabinosa

L'operó *ara* d'*E. coli* és un sistema més complex que el descrit anteriorment de la lactosa. En aquest cas l'operó codifica per a tres enzims que es requereixen per catalitzar el metabolisme de l'arabinosa<sup>1</sup>: l'arabinosa isomerasa (**araA**), la ribulosa quinasa (**araB**) i la ribulosa-5-fosfat epimerasa (**araD**).

L'operó *ara* presenta una regió reguladora amb dos operadors (**araO<sub>1</sub>**) i (**araO<sub>2</sub>**); una zona anomenada **aral** (amb els seu corresponent promotor) on s'uneix el gen regulador **araC**. Finalment, un lloc d'unió per a CAP-AMPc, una proteïna activadora necessària per la unió del RNA polimerasa al promotor.

La proteïna *araC* exerceix una regulació positiva i negativa en funció de les condicions del medi. Sota un control positiu, els gens no s'expressen fins que una proteïna inductora, en aquest cas *aral*, s'uneixi a l'operador. Sota un control negatiu, els gens s'expressen constantment fins que una proteïna repressora, en aquest cas *araC*, s'uneix a l'operador.

Quan **no hi ha arabinosa** al medi, la proteïna *araC* s'uneix a *araO<sub>2</sub>* i a *aral*, de tal forma que s'impedeix la transcripció dels gens estructurals.

Quan **hi ha arabinosa** al medi, el complex CAP-AMPc augmenta i s'uneix amb l'arabinosa a *aral* augmentant la transcripció. A més, l'arabinosa s'uneix a *araC* i canvia la seva conformació.

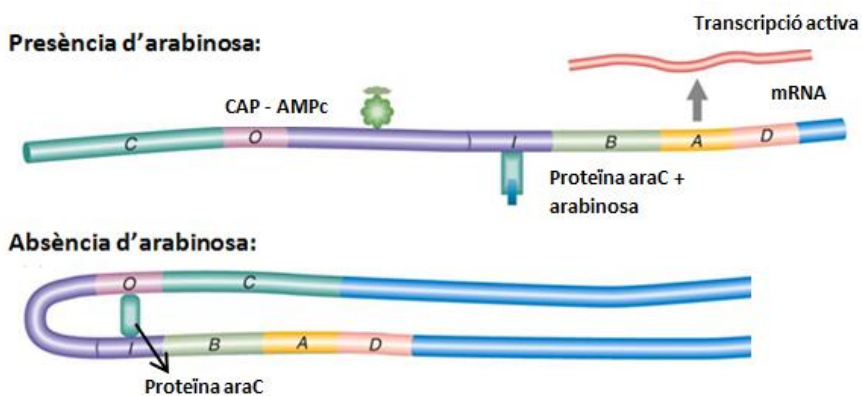


FIG. 12: Operó *ara* amb presència i absència d'arabinosa al medi.

<sup>1</sup> *Arabinosa*: és un glúcid monosacàrid que conté cinc àtoms de carboni i un grup funcional aldehid. Pertany al grup de les aldopentoses.

El plasmidi pGLO que he emprat per la pràctica d'aquest treball conté *l'operó ara*, però modificat. Els gens estructurals propis de *l'operó ara* han estat substituïts pel gen responsable de la síntesi de la proteïna GFP. La presència d'arabinosa al medi és fonamental per a la transcripció dels gens, és a dir, perquè els bacteris que contenen el plasmidi presentin fluorescència sota la llum ultraviolada. Per aquest motiu, amb l'objectiu de que s'expressi la proteïna GFP en la transformació, he utilitzat un medi de cultiu amb arabinosa.

### 1.7. *Aequorea victoria*

La medusa *Aequorea victoria* habita a la costa oest de Nord Amèrica i en els últims anys la seva població està augmentant degut a la desaparició dels seus depredadors.

A plena llum del dia és casi invisible, però a la foscor de les profunditats de l'oceà emet una llum verda gràcies a la proteïna GFP. D'aquesta manera atrau a les preses, que queden atrapades als seus tentacles, els quals tenen nematocists, que contenen un verí que paralitza les seves víctimes.



FIG. 13: *Aequorea victoria*

<b>Regne</b>	Animalia
<b>Filum</b>	Cnidaria
<b>Classe</b>	Hydrozoa
<b>Ordre</b>	Hydroida
<b>Família</b>	Aequoreidae
<b>Gènere</b>	<i>Aequorea</i>
<b>Espècie</b>	<i>A. victoria</i>

FIG. 14: Classificació científica *Aequorea victoria*

### 1.8. Metabolisme bacterià

Tots els éssers vius realitzen una sèrie de processos que els proporcionen els nutrients necessaris per viure. Aquest conjunt de processos se'ls coneix com metabolisme i consisteix en un gran nombre de **reaccions químiques catabòliques** (degradació de compostos per tal d'obtenir energia) i **anabòliques** (reaccions de síntesi).

Podem establir diferents tipus de metabolisme bacterià segons tres criteris diferents:

### 1. Segons la font de carboni que utilitzen

- **Autòtrofs:** sintetitzen els nutrients per créixer a partir de substàncies inorgàniques senzilles. El carboni l'obtenen del CO<sub>2</sub>.
- **Heteròtrofs:** la seva font de carboni és orgànica. Per exemple obtenen el carboni a partir de la glucosa.
- **Mixòtrof:** el carboni s'obté tant de compostos orgànics com de la fixació del diòxid de carboni.

### 2. Segons els donadors d'electrons

- **Litòtrof:** utilitzen com a donadors d'electrons matèria inorgànica. Per exemple: Fe, SO, NH<sub>3</sub>, etc.
- **Organòtrof:** utilitzen com a donadors d'electrons matèria orgànica. Per exemple: lípids, proteïnes, etc.

### 3. Segons la font d'energia

- **Quimiòtrofs:** l'energia s'obté de l'oxidació de compostos químics externs. Pot ser respiració aeròbica (amb presència d'O<sub>2</sub>) o respiració anaeròbica (sense O<sub>2</sub>, utilitzen altres substàncies oxidants com un sulfat o un nitrat).
- **Fotòtrofs:** l'energia s'obté de la llum solar a través de la fotosíntesi.

## 1.9. Relació dels bacteris amb l'hoste

Els humans, per exemple, per viure necessitem els milions de bacteris que es troben dins del nostre organisme. Un exemple clar són els bacteris del nostre intestí. Aquest necessiten viure-hi, ja que fora no podrien fer-ho. Nosaltres els alimentem i, a canvi, ells afavoreixen l'absorció de nutrients convertint en aprofitables alguns residus de la dieta que no podem digerir; ens aporten vitamina K i regulen part de les nostres defenses.

La composició de la flora bacteriana, sobretot en els primers mesos de vida, és clau per al desenvolupament del sistema immunitari. Els nens amb flors bacterianes més riques i variades presenten un menor desenvolupament de malalties i al·lèrgies.

Per tant, alguns bacteris que ens parasiten ens aporten beneficis, com en els casos explicats anteriorment. Aquesta relació d'ajuda mútua s'anomena **simbiosi**. Per altra banda, la majoria dels bacteris de la nostra microbiota són **comensals**, és a dir, comparteixen el nostre menjar sense causar cap mal ni benefici. La presència d'una microbiota equilibrada protegeix a l'individu de la invasió de bacteris **patògens**, que són aquells que parasiten l'hoste causant-li mal i poden provocar malalties infeccioses.

Aquest treball es centra en la relació entre els antibiòtics i els bacteris causants de malalties. Però hem de tenir sempre en compte que quan prenem un antibiòtic per eliminar als bacteris patògens, alhora matem bacteris inofensius que ens protegeixen de les infeccions.

### 1.10. *Escherichia coli*

Durant l'experimentació del treball de recerca he emprat el bacteri *Escherichia coli*. Aquest és un bacteri gramnegatiu habitual a l'intestí dels mamífers que pot ser patògen i provocar infeccions intestinals, però la majoria de les soques són inofensives. És el principal bacteri aeròbic facultatiu del sistema digestiu, és a dir, pot créixer en medis amb presència i absència d'oxigen. Si *E. coli* no és patògen, actua com a comensal formant part de la flora intestinal.

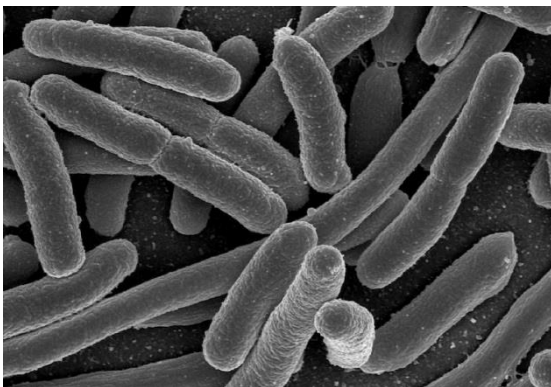


FIG. 15: *Escherichia coli*.

<b>Domini</b>	Eubacteria
<b>Fílum</b>	Proteobacteria
<b>Classe</b>	Gammaproteobacteria
<b>Ordre</b>	Enterobacteriales
<b>Família</b>	Enterobacteriaceae
<b>Gènere</b>	<i>Escherichia</i>
<b>Espècie</b>	<i>Escherichia coli</i>

FIG. 16: Classificació científica *E. coli*.

## 1.11. Mètodes de cultiu

Un medi de cultiu és una solució, una suspensió aquosa o un gel amb una sèrie de compostos químics i requeriments nutritius que proporcionaran les condicions adequades perquè es reproduïxin els microorganismes.

Segons la seva composició química parlem de **medis definits** (presenten una composició perfectament establerta) i **medis complexos** (la seva composició és variable).

Tant si es tracta d'un medi definit o complex, parlem de **medis líquids**, els seus ingredients es dissolen en aigua; **medis sòlids**, formats per un agent solidificant, la majoria dels casos per agar-agar (gelatina vegetal); i **medis fluïts**, que són medis semi sòlids.

En aquest treball he utilitzat un medi de cultiu sòlid format per agar-agar com a agent solidificant.

Existeixen tres medis de cultiu adequats per a l'aïllament i la identificació de microorganismes:

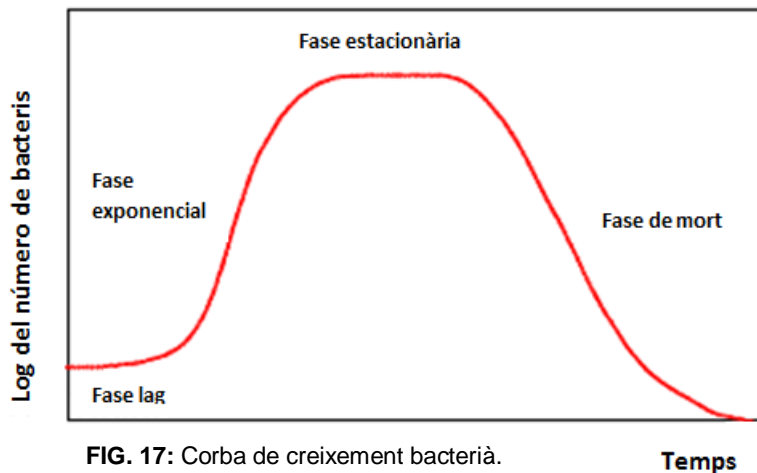
- **Medi d'enriquiment:** és un medi líquid que afavoreix el creixement d'uns bacteris sense impedir el creixement d'uns altres.
- **Medis selectius:** és un medi format per compostos que impedeixen el creixement de determinades espècies de bacteris i afavoreixen el creixement d'unes altres.
- **Medis diferencials:** permeten diferenciar entre gènere i espècie.

Tots els medis de cultiu, un cop preparats, s'han de sotmetre a un control d'esterilitat. S'incuben a 30°C durant 24-48 hores i, si el medi és estèril, no hi ha d'haver creixement.

També és essencial l'esterilització del material de laboratori abans i durant la realització del treball.

### 1.11.1. Creixement bacterià en un medi de cultiu

En el creixement bacterià podem diferenciar quatre fases:



- **Fase lag:** és la fase d'adaptació. El bacteri es prepara per fer ús dels nutrients que li aporta el medi. Augmenta la massa cel·lular però no el nombre.
- **Fase exponencial:** la velocitat de creixement és màxima. Els bacteris consumeixen els nutrients que els proporciona el medi.
- **Fase estacionària:** el nombre de bacteris no augmenta per falta de nutrients en el medi o perquè durant el creixement exponencial els bacteris han alliberat toxines que ho impedeixen.
- **Fase de mort:** és redueix el nombre de bacteris.

## 2. Els antibiòtics

### 2.1. Què són?

Els antibiòtics són substàncies naturals (produïdes per organismes) que directament destrueixen o maten els bacteris (**efecte bactericida**) o inhibeixen el creixement bacterià (**efecte bacteriostàtic**) donant l'oportunitat al sistema immunitari de destruir els gèrmens que queden.

Molts antibiòtics comercials s'alteren químicament per a millorar la seva potència o ampliar el nombre d'espècies a què afecten.

## 2.2. Mecanismes d'acció

Els antibiòtics deuen la seva toxicitat selectiva a les diferències entre les cèl·lules eucariotes i procariotes. Intenten incidir en les funcions vitals dels bacteris. Algunes de les vies d'acció més utilitzades són:

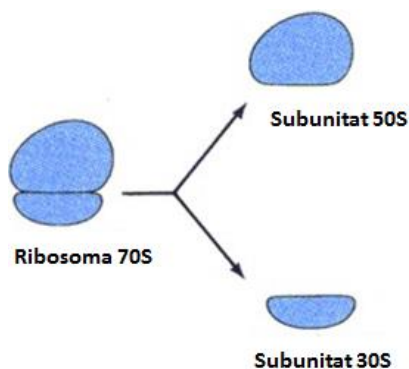
- **Bloqueig de la síntesi de la paret cel·lular**

Com ja he dit abans, la paret dels bacteris està formada per peptidoglicans. A causa del creixement constant dels bacteris, aquests estan contínuament sintetitzant nous peptidoglicans i transportant-los al lloc adequat de la paret bacteriana.

Hi ha antibiòtics que s'encarreguen d'interrompre aquest procés atacant els enzims implicats i impedit que la paret cel·lular es formi correctament i sigui osmòticament fràgil. Per tant, ja que els bacteris tenen una pressió osmòtica interna molt alta, és produïx la lisi cel·lular. Aquest efecte el produeixen les penicil·lines i cefalosporines, que són considerats antibiòtics bactericides.

- **Inhibició de la síntesi de proteïnes**

La síntesi de proteïnes es dona als ribosomes del bacteri, formats per dues subunitats: una de 50S i una de 30S.



**FIG. 18:** Subunitats dels ribosomes.

Alguns antibiòtics, com els aminoglicòsids, es fixen irreversiblement a la subunitat 30S i interfereixen en la fixació de l'RNA de transferència (tRNA), que s'encarrega de transportar els aminoàcids al ribosoma per la síntesi de proteïnes. També actuen contra l'RNA missatger (mRNA), que és la cadena d'RNA, transcrita a partir de DNA, que porta la informació fins al ribosoma.

Per tant, es produeix una lectura errònia del missatge genètic i la síntesi de proteïnes no funcionals.

Hi ha altres antibiòtics, com el cloramfenicol, que s'uneixen a la subunitat de 50S i bloquegen l'activitat de l'enzim peptidil transferasa, encarregat de la formació dels enllaços peptídics entre els aminoàcids.

Els antibiòtics que inhibeixen la síntesi de proteïnes són d'efecte bacteriostàtic, ja que impedeixen el creixement i la reproducció del bacteri.

- **Alteració sobre la membrana plasmàtica**

La membrana plasmàtica és una estructura vital per a la supervivència del bacteri. Constitueix una barrera de permeabilitat i s'encarrega de regular el pas de substàncies de la cèl·lula. Els antibiòtics acostumen a formar porus sobre la membrana del bacteri de manera que s'interromp el transport de substàncies. Com a conseqüència, els ions i les macromolècules s'escapen, el bacteri no obté l'energia necessària i mor.

Aquest efecte és produït per l'acció d'antibiòtics bactericides com la polimixina. L'inconvenient d'aquests antibiòtics és que, a causa de la presència de membrana tant en cèl·lules eucariotes com procariotes, molts són tòxics per als humans.

- **Bloqueig de la síntesi dels àcids nucleics**

La síntesi de molècules de DNA i RNA consisteix en una sèrie de reaccions catalitzades per enzims. Si s'inhibeix un punt de la seqüència, automàticament queda bloquejada la reacció. Hi ha antibiòtics, com les sulfamides, que interfereixen en la síntesi d'àcids nucleics. Especialment ho fan bloquejant la síntesi dels seus components, impedit la replicació o aturant la transcripció. Aquests antibiòtics són d'efecte bacteriostàtic.

- **Inhibidors del metabolisme bacterià**

Alguns antibiòtics actuen en la síntesi de l'àcid tetrahidrofòlic, imprescindible per a la supervivència dels bacteris. Aquest és sintetitzat a partir d'àcid fòlic i de l'enzim dihidrofolat reductasa. L'àcid tetrahidrofòlic és necessari per a la formació d'aminoàcids, de purines i pirimidines necessàries per a la replicació del DNA. Per tant, aquests antibiòtics impedeixen el creixement i la replicació bacteriana (efecte bacteriostàtic).

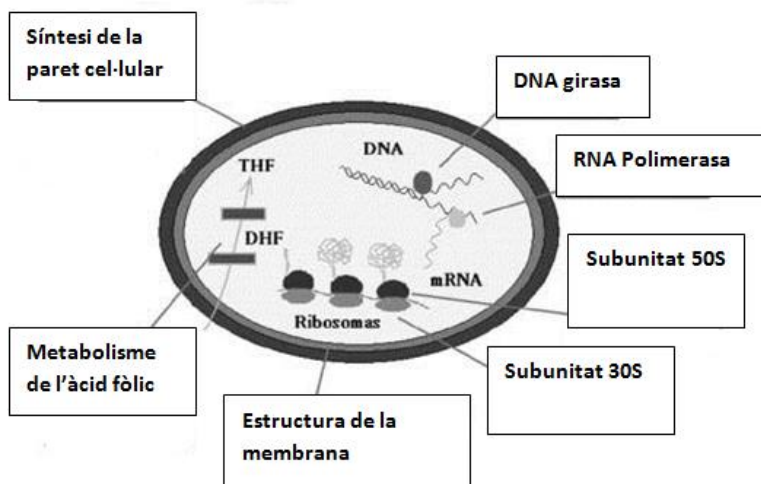


FIG. 19: Zones d'acció dels antibiòtics.

### 2.3. Famílies d'antibiòtics

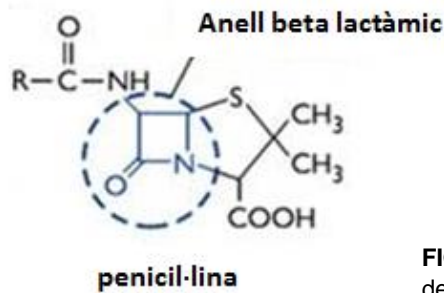
Els antibiòtics poden classificar-se segons la forma amb què produeixen la mort o inhibició bacteriana en: antibiòtics temps-dependent o concentració-dependent.

En el cas dels temps-dependent, el seu èxit terapèutic es basa en el temps d'acció; a diferència dels concentració-dependent que es basa en la concentració subministrada.

Dins dels antibiòtics que depenen del temps trobem dos subgrups:

- **Beta lactàmics**: són antibiòtics naturals o semi sintètics que es caracteritzen per posseir un anell beta lactàmic. Actuen inhibint l'última etapa de la síntesi de la paret bacteriana. Constitueix la família d'antibiòtics més utilitzada en la pràctica clínica, però l'aparició constant de resistències adquirides ha limitat el seu ús.

Els classifiquem en quatre grups: **penicil·lines**, amb efecte antimicrobià en cocs i bacils; **cefalosporines**, inactives davant d'enterococs i estafilococs; **monobactamics**, manca d'activitat sobre grampositius i bacteris anaeròbics; i **carbapenems**, són els beta lactàmics amb el major espectre d'activitat.



**FIG. 20:** Estructura molecular de la penicil·lina.

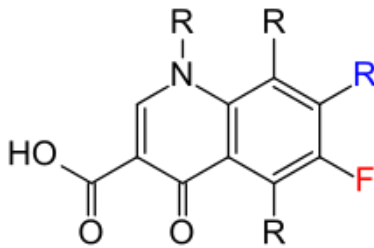
- **Macròlids:** són antibiòtics semi sintètics. Inhibeixen la síntesi proteica del bacteri adherint-se a la subunitat 50S dels ribosomes. L'aparició de resistències bacterianes a aquest tipus d'antibiòtic és de fàcil transmissió a través dels plasmidis.

Dins dels antibiòtics que depenen de la concentració trobem tres subgrups:

- **Glicopèptids:** actuen sobre la paret bacteriana. Avui dia s'utilitzen la **vancomicina** i la **teicoplanina**. Els glicopèptids, a més d'inhibir la paret cel·lular, alteren la permeabilitat de la membrana i la síntesi del RNA. Els seus múltiples mecanismes d'acció fan que sigui un grup d'antibiòtics amb un nivell baix de resistència bacteriana.
- **Aminoglicòsids:** actuen sobre la subunitat 30S dels ribosomes, de forma que interfereixen en la lectura correcte del codi genètic. Aquesta acció impedeix la síntesi de proteïnes del bacteri i, per tant, hauria de ser d'efecte bacteriostàtic; però el seu efecte és bactericida, és a dir, mata directament al bacteri enlloc d'inhibir el seu creixement. Es desconeixen els factors que donen aquesta capacitat bactericida als aminoglicòsids, però una de les hipòtesis és que presenta un prolongat efecte post antibiòtic que podria acabar matant als bacteris.

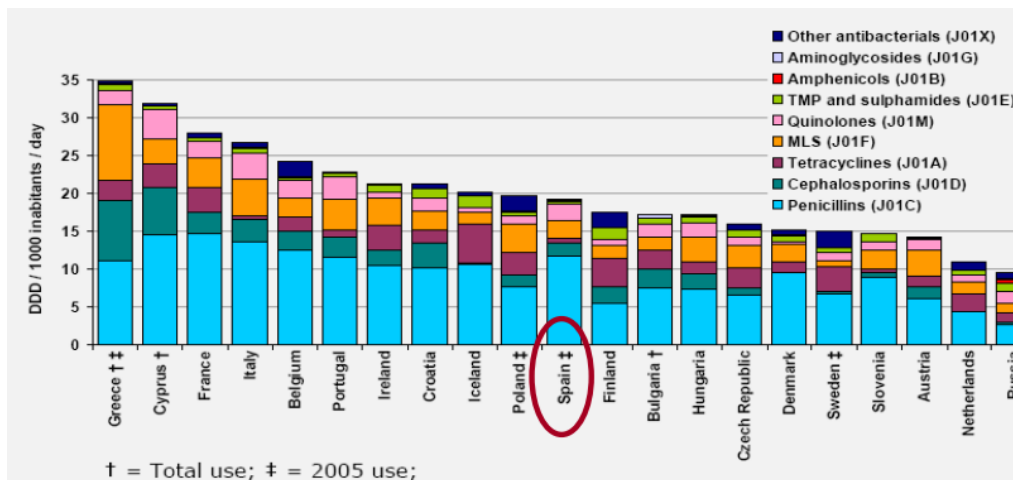
Un exemple d'aminoglicòsid és l'estreptomicina, que actualment ajuda a combatre infeccions com la tuberculosi.

- **Quinolones:** són un grup d'antibiòtics d'ampli espectre. La major part de les quinolones utilitzades a la clínica són les fluoroquinolones, que es caracteritzen per tenir un grup fluorur. Actuen inhibint el DNA girasa, enzim que catalitza el superenrotllament del DNA cromosòmic. A concentracions altes les quinolones també poden impedir la síntesi del RNA.



**FIG. 21:** Estructura molecular de les fluoroquinolones.

El següent gràfic<sup>2</sup> mostra la distribució diària de l'ús d'antibiòtics per cada 1000 habitants als diferents països d'Europa l'any 2006. Es pot observar que les penicil·lines són les més emprades en general i que Grècia és el país que fa un consum més elevat d'antibiòtics.



**FIG. 22:** Ús d'antibiòtics a Europa l'any 2006. Espanya apareix remarcada de color vermell.

<sup>2</sup> EARSS. (18 de novembre de 2008). *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* .

## 2.4. Descobriment i evolució dels antibiòtics

Junt amb les mesures d'higiene i salut, els antibiòtics suposen un punt d'inflexió en la mortalitat del segle XX.

L'any 1928 el metge i bacteriòleg Alexander Fleming va observar un cultiu de *Staphylococcus aureus* on havia crescut el fong *Penicillium notatum* i va veure que al voltant d'aquest no hi havia creixement bacterià. A partir d'aquesta observació es va dedicar a estudiar el compost que alliberava la floridura, al que va anomenar penicil·lina.

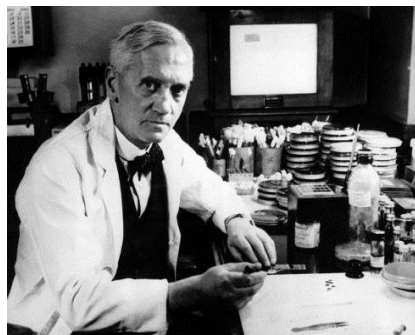


FIG. 23: Alexander Fleming.

Durant la Segona Guerra Mundial es va veure la necessitat de millorar els tractaments antibacterians i, per això, es van començar a aïllar penicil·lina. L'any 1940 va ser utilitzada per primer cop en humans.

Cap al 1950, l'ús d'antibiòtics havia reduït la gravetat d'infeccions com la tuberculosi i la pneumònia, que fins aleshores eren mortals.

Abans dels antibiòtics, el 90% dels nens que es contagiaven de meningitis bacteriana morien. Entre els nens que sobreviuen, la majoria tenien discapacitats greus com sordesa o trastorns mentals. Un estudi de la OMS diu que entre els anys 1996-2006 va haver-hi 2.731 casos de meningitis bacteriana a Europa i els Estats Units, 13 dels quals van morir. Una taxa de mortalitat, per tant, del 0,47%.

L'ús d'aquests fàrmacs ha marcat un abans i un després en la història de la humanitat, s'ha reduït la gravetat d'infeccions i han permès que la realització d'intervencions quirúrgiques, que fins la meitat del segle XX tenien un elevat percentatge de mortalitat, tinguin un mínim risc d'infeccions.

Tot i això, el mal ús que hem fet dels antibiòtics ha portat al desenvolupament de resistències bacterianes, tal i com s'explica en els següent apartat d'aquest treball. Quan parlem d'efectuar un ús incorrecte dels antibiòtics ens referim a l'ús generalitzat d'antibiòtics per professionals de la salut i ramaders; però

també al fet de prendre antibiòtics sense prescripció mèdica, exigir al metge la prescripció d'antibiòtics, comprar antibiòtics a la farmàcia sense recepta o prendre la dosis inadequada o de forma irregular, sense finalitzar el tractament.

“Aquest problema és tan greu, que posa en perill els èxits de la medicina moderna. Una era post antibiòtics en què infeccions comunes i lesions menors puguin matar és una possibilitat molt real al segle XXI”, alerta la OMS<sup>3</sup>.

### 3. Resistència dels bacteris als antibiòtics

#### 3.1. Què és la resistència als antibiòtics?

La resistència bacteriana és la capacitat d'un bacteri a resistir l'acció d'un antibiòtic. Hi ha dos tipus de resistències:

- **La resistència natural:** és una característica constant en les soques d'una mateixa espècie bacteriana, és a dir, determinada genèticament.
- **La resistència adquirida:** és la capacitat d'un microorganisme a resistir a un antibiòtic al que anteriorment era sensible. Llavors, els tractaments habituals es tornen ineficaços, les infeccions persisteixen i es poden transmetre a altres persones.

L'ús inadequat dels antibiòtics crea condicions favorables a l'aparició i propagació de bacteris resistents. Una altre factor que ha portat al desenvolupament de soques resistents és la **pressió selectiva**, és a dir, des de l'aparició dels antibiòtics els humans els hem pres i administrat a altres animals i, com a conseqüència, només han sobreviscut els bacteris més aptes, aquells que eren resistents a l'antibiòtic i que són els que s'han reproduït. D'aquesta manera han mort les soques sensibles i han sobreviscut les resistents.

---

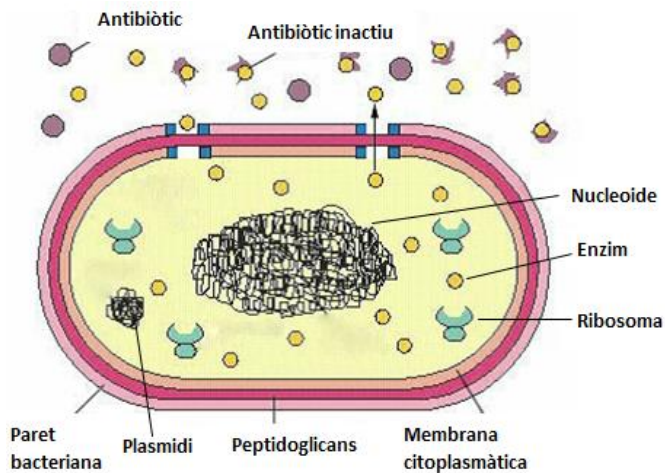
<sup>3</sup> WHO. (s.f.). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*.

### 3.2. Mecanismes de resistència

Des del punt de vista molecular i bioquímic existeixen tres mecanismes, que es poden donar alhora, pels quals un bacteri és resistent a un antibiòtic:

- **Inactivació de l'antibiòtic**

Aquest procés es dona mitjançant la producció d'enzims amb la funció d'alterar l'antibiòtic i desactivar-lo, ja sigui destruint-lo (hidròlisi) o modificant la seva estructura química.



**FIG. 24:** Mecanisme d'inactivació de l'antibiòtic.

Un exemple són els estafilococs, ja que molts contenen  $\beta$ -lactamasas, un enzim que trenca l'anell  $\beta$ -lactàmic present en les penicil·lines. Aquest, tal i com he explicat anteriorment, és el mecanisme de resistència que presentarà *E. coli* després de la transformació bacteriana que és realitzarà.

En la major part dels casos aquest mecanisme el causa un plasmidi R, és a dir, un plasmidi de resistència.

- **Alteració del lloc blanc de l'antibiòtic**

Aquest mecanisme consisteix en modificar el lloc d'acció de l'antibiòtic. Existeixen diverses estratègies per aconseguir-ho, des de la modificació d'alguna part de l'anatomia cel·lular, fins a l'adquisició d'un gen que codifiqui per la creació d'un substitut del blanc original.

Un dels llocs d'acció dels antibiòtics són els ribosomes, per això, és una de les estructures bacterianes que els bacteris modifiquen com a mecanisme de resistència. Per exemple: la metilació de l'RNA ribosomal de la subunitat 50S, és a dir, l'aparició de CH<sub>3</sub> (metil) a l'RNA del ribosoma. Aquest canvi en el ribosoma produeix resistència als bacteris *S.aureus* i *S.epidermidis* contra antibiòtics com el cloramfenicol i les tetraciclines. També pot haver modificació en la subunitat 30S del ribosoma.

Altres zones que poden adoptar una altra estructura són la paret bacteriana i la membrana plasmàtica, que també són zones d'acció dels antibiòtics.

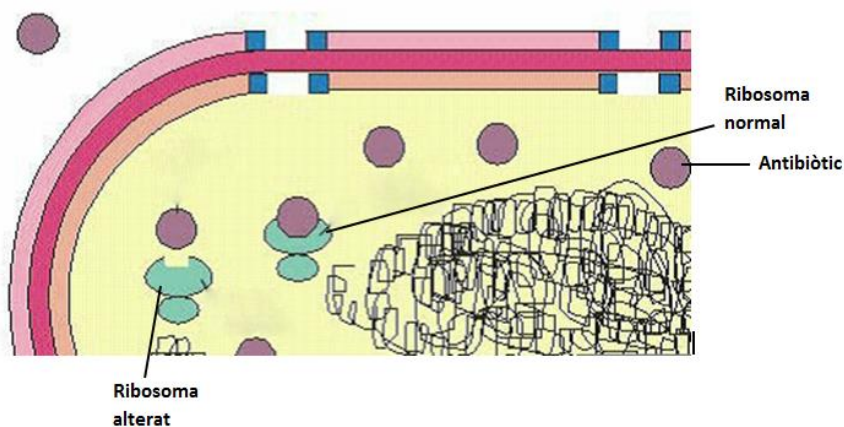


FIG. 25: Mecanisme d'alteració del blanc.

- **Alteracions de permeabilitat**

Aquest mecanisme es deu a canvis que es poden efectuar en els receptors bacterians específics pels antimicrobians a causa d'una alteració dels components de la membrana o de la paret cel·lular. Això influeix en la permeabilitat i en la capacitat de transport actiu de substàncies a través de la membrana. Podem distingir dos tipus: alteració a la membrana plasmàtica externa i en l'entrada i sortida d'antibiòtics.

- a) **Alteració a la membrana plasmàtica externa**

Especialment esdevé en bacteris gramnegatius, ja que la membrana està formada principalment per lípids. La presència de la bicapa lipídica produeix la impermeabilitat a les substàncies hidròfiles, ja que

els lípids situats a la part exterior són de caràcter hidròfil o polar i es produeix repulsió. Les substàncies hidròfiles passen a través d'unes proteïnes de membrana, anomenades **porines**. Aquestes proteïnes formen canals plens d'aigua a la membrana externa que regulen l'entrada d'algunes substàncies, entre elles els antibiòtics. Els canvis en la seva conformació poden impedir el seu accés dins el bacteri.

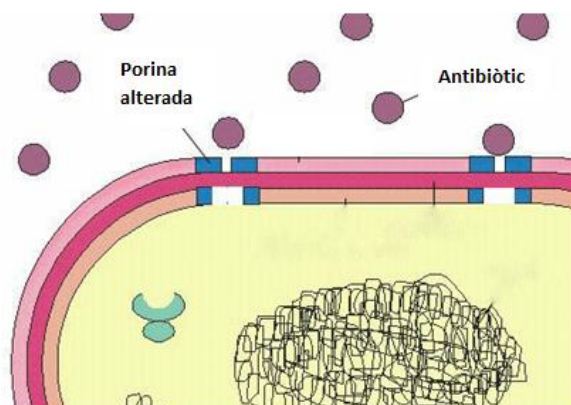


FIG. 26: Alteració de la membrana plasmàtica externa.

### b) Alteració en l'entrada i sortida d'antibiòtics

A les membranes plasmàtiques es troben les anomenades **bombes d'efluxió**, que expulsen els antibiòtics. Aquest procés consisteix en agafar l'antibiòtic quan es troba a l'espai periplàsmic, que com he dit anteriorment, és l'espai entre les dues capes de la membrana dels bacteris gramnegatius. A continuació l'antibiòtic és expulsat a l'exterior i s'evita que arribi al seu lloc d'acció.

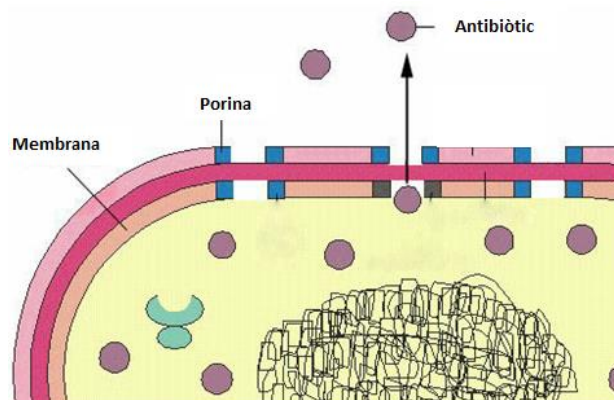


FIG.27: Bomba d'efluxió.

Els tres mecanismes de resistència descrits anteriorment els poden obtenir els bacteris a partir de diferents processos. Molts **hereten els gens** dels seus predecessors. Altres els obtenen a partir de **mutacions genètiques**, molt freqüents en bacteris, que produiran de forma espontània un gen de resistència o en perfeccionaran un d'existent. Un procés també molt comú és rebre els gens de resistència d'altres bacteris veïns, amb els mecanismes de **parasexualitat bacteriana**, explicats a l'apartat de la reproducció bacteriana. Amb aquests processos el més comú és integrar el gen de resistència en el plasmidi o en el cromosoma bacterià. Molt sovint un bacteri transfereix les seves característiques de resistència a altres bacteris mitjançant la **donació d'un plasmidi**.

Els antibiòtics poden seleccionar soques resistents a ells mateixos, és a dir, poden estimular la supervivència i propagació dels bacteris.

Quan un antibiòtic ataca a un grup de bacteris, destrueix els que són molt sensibles. Però els que presentaven resistència des del principi o que l'han desenvolupat més tard, poden sobreviure, especialment si s'administren quantitats insuficients d'antibiòtic. D'aquesta manera, a l'estimular el creixement de patògens resistents, un antibiòtic pot contribuir a la seva pròpia destrucció.

L'augment de la resistència en patògens no és l'única activitat negativa dels antibiòtics. Quan un medicament ataca els bacteris que produeixen la malaltia, també afecta els bacteris benignes, que habiten en simbiosi a l'organisme. S'eliminen bacteris sensibles inofensius, la presència dels quals podria haver limitat l'expansió dels patògens, i alhora s'estimula el creixement de bacteris resistents.<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup> B. Levy, S. (Mayo de 1998). La resistencia contra los antibióticos. *Investigación y ciencia* (260), págs. 14-21.

### 3.3. Agents antibacterians: una nova amenaça

Actualment no només fem un ús excessiu dels antibiòtics, sinó que també abusem d'altres agents antibacterians, compostos que inhibeixen el creixement o la reproducció dels bacteris però que no es poden emprar com a medicaments perquè resulten massa tòxics pel nostre organisme. Per exemple, el triclocarboni, triclosano, clorur de benzalconi i altres compostos d'amoni quaternari.

La majoria dels antibacterians s'empraven en els hospitals per a desinfectar gases o altres materials, però ara es poden trobar com additius en la fabricació de sabó, detergents i fins i tot per joguines o estris de cuina.

Els gens de resistència als antibacterians també són transportats, en gran part dels casos, per plasmidis que, com ja he explicat anteriorment, porten gens de resistència a antibiòtics. Per tant, fer un abús d'aquests compostos estimula la propagació de **resistències dobles**: contra antibacterians i contra antibiòtics.

Una alternativa a la utilització d'aquests agents per a la neteja són els detergents sense productes antibacterians, ja que també estan capacitats per reduir el nombre de bacteris potencialment perillosos. Per altra banda productes com el lleixiu, l'alcohol o l'amoníac, eliminen els bacteris però són de ràpida evaporació i, per això, no deixen residus que perduren i no fan **pressió selectiva**.

### 3.4. Malalties resistents

Cada nova dècada ha portat un augment de la freqüència de bacteris que planten cara no només a un sinó a diferents antibiòtics i el control dels quals resulta extremadament complicat. Per tant, ens situem davant de dos grans problemes: una resistència emergent als antibiòtics i una manca de nous fàrmacs per al tractament d'infeccions causades per bacteris resistents a múltiples antibacterians.

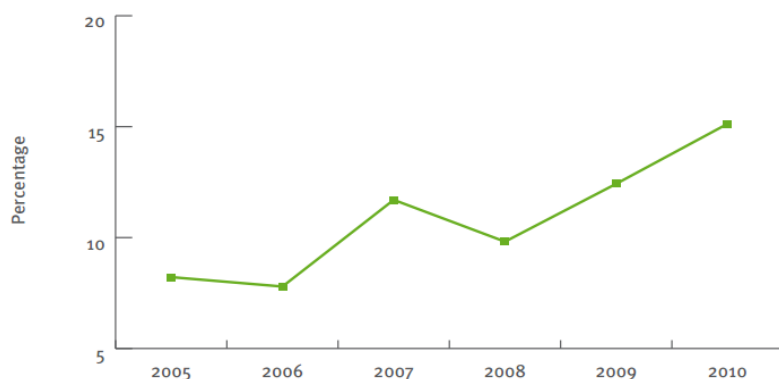
Avui dia, destaca especialment *Mycobacterium tuberculosis* (causant de la tuberculosi), que ha incrementat el seu índex de mortalitat després d'haver entrat en retrocés en els països desenvolupats.

La tuberculosi (TB) segueix essent un problema mundial que en l'actualitat afecta a uns nou milions de persones. En els últims anys s'ha multiplicat el número de casos de TB causats per soques resistents als antibiòtics.

L'any 2012, entre els casos de tuberculosi pulmonar hi va haver 450.000 casos causats per soques **multi resistents**, és a dir, són les que presenten resistència com a mínim a dos fàrmacs, la isoniazida i la rifampicina, que són els més efectius per tractar la malaltia.

En alguns països s'ha desenvolupat una forma encara més resistent anomenada tuberculosi **ultra resistent**, que respon a un nombre encara més baix de fàrmacs. Actualment ja s'han notificat casos en noranta dos països del món.

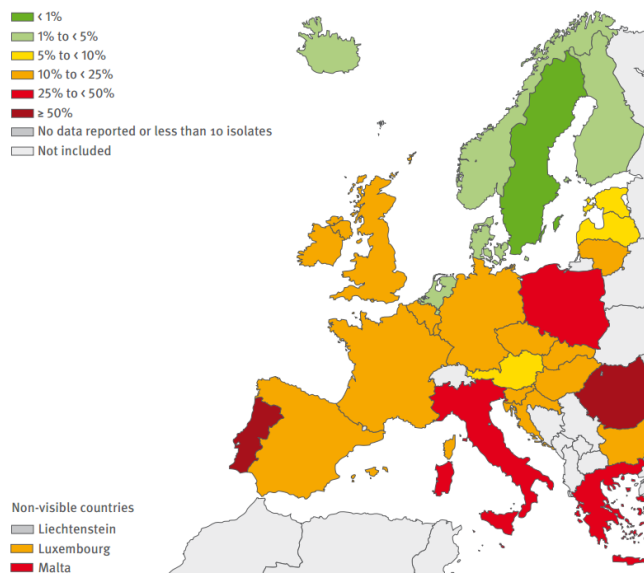
El següent gràfic<sup>5</sup> mostra l'evolució de les resistències als carbapenems en soques *Klebsella pneumoniae*, causant d'infeccions del tracte urinari, pneumònies, sèpsia, infeccions de teixits tous, i infeccions de ferida quirúrgica, aïllades a divuit països d'Europa (140 laboratoris) entre el 2005 i 2010. El percentatge de resistències ha incrementat del 8% al 16%, és a dir, s'ha duplicat en cinc anys.



**FIG.28:** Evolució de les resistències als carbapenems en aïllaments en sang de *K. Pneumoniae*.

<sup>5</sup> EARSS. (2005-2010). *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*.

La OMS alerta: “un alt percentatge d’infeccions hospitalàries es deu a bacteris molt resistents entre ells *Staphylococcus aureus* resistent a la meticil·lina”, un bacteri capaç de generar una llarga llista de malalties, com pneumònia, meningitis o infeccions cutànies. Al mapa (FIG.29) observem que la taxa de resistència de *S.aureus* a Espanya es troba entre 10-25%. Però països propers com Itàlia és troben en un 25-50% o Portugal, que supera el 50%.



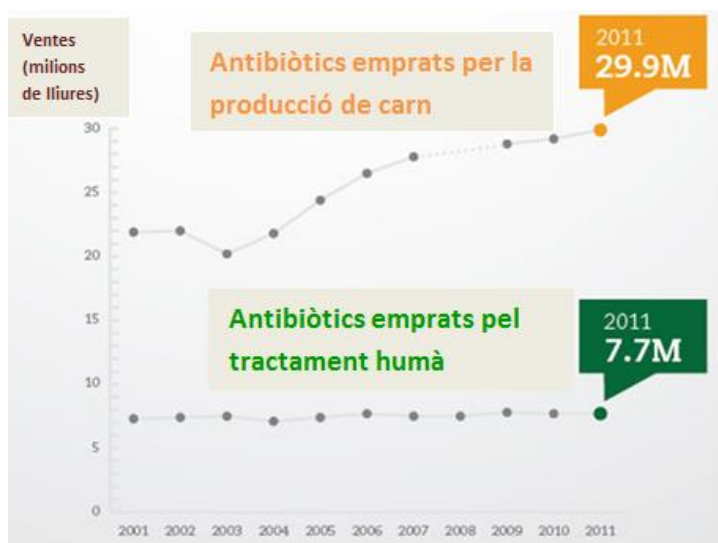
**FIG.29:** Resistència a la meticil·lina en aïllaments en sang de *S.aureus*. (EARSS, 2012).

### 3.5. El perill de les granges

En l’actualitat, s’empren més antibiòtics en la indústria alimentària que en la farmacèutica (FIG.30). Les granges d’explotació intensiva tendeixen a utilitzar una alta quantitat d’antimicrobians que exerceixen una gran pressió selectiva sobre els bacteris.

Com a conseqüència han aparegut dos problemes: en primer lloc, els bacteris que desenvolupen una mutació que els fa resistents poden ser patògens, i si ens exposem a ells a través de la cadena alimentària, ens poden provocar malalties per a les quals no serveixen els antibiòtics. En segon lloc, els bacteris poden transferir gens de resistència a altres bacteris pròxims, entre ells els que provoquen malalties als humans.

Durant els últims anys s'han aïllat soques *E. coli* resistents en granges de porcs i pollastres que transporten **plasmidis multi resistents**, és a dir, que proporcionen la facultat de sobreviure davant de diferents antibiòtics.



**FIG.30:** Milions de lliures invertides en antibiòtics per a granges dels EUA entre el 2001 i el 2011.

### 3.6. Què cal fer per prevenir?

Les amenaces per a la salut que planteja la resistència als antimicrobians s'han d'abordar amb urgència, de forma coordinada i des de diferents vessants.

Una de les principals causes de l'aparició de resistències és el mal ús que fem dels antibiòtics. Per tant, el primer pas de prevenció és prendre'n només quan ens els hagi prescrit el metge. A més, s'ha de prendre l'antibiòtic durant el temps establert i no deixar de fer-ho encara que ens sentim millor amb les primeres dosis.

Per altra banda, metges i farmacèutics han de subministrar els antibiòtics només quan sigui realment necessari i dur a terme un gran control i prevenció de les infeccions.

Finalment, un factor fonamental és la conscienciació social a través de la premsa i la televisió. S'ha de regular i fomentar l'ús apropiat dels medicaments i promoure la investigació i el desenvolupament de nous tractaments. En cas contrari, correm el perill d'entrar en una era post antibiòtics que pot acabar amb la medicina moderna tal i com la coneixem.

### 3.7. Antibiograma

Una part essencial per iniciar la part pràctica del meu treball de recerca ha consistit en la realització d'un antibiograma.

Entenem per antibiograma l'estudi *in vitro* de la sensibilitat dels bacteris als antibiòtics. Aquest mètode ens proporciona informació sobre el grau de sensibilitat d'una soca bacteriana i sobre quin antibiòtic és més eficient per combatre-la.

S'utilitza en el camp de la medicina per comprovar quin antibiòtic és l'adequat per a un pacient.

En el meu cas m'ha permès saber si *E. coli*, bacteri amb el qual he treballat, és sensible o resistent als antibiòtics subministrats.

#### 3.7.1. Antibiòtics per l'antibiograma

Per l'antibiograma he emprat quatre tipus d'antibiòtics:

- **Ampicil·lina:** és un antibiòtic beta lactàmic i per tant, inhibeix la síntesi de la paret cel·lular. Deriva del grup de les penicil·lines.
- **Amoxicil·lina:** és un antibiòtic semi sintètic derivat de les penicil·lines. Té un ampli espectre d'activitat, però no és estable davant les  $\beta$ -lactamasas.
- **Amoxicil·lina/ Àcid Clavulànic:** si l'amoxicil·lina conté àcid clavulànic és torna estable davant les  $\beta$ -lactamasas, ja que aquest actua com a inhibidor enzimàtic.
- **Eritromicina:** és un antibiòtic macròlid. Sovint s'utilitza en persones al·lèrgiques a les penicil·lines.

# PART PRÀCTICA

## 1. Objectiu de la investigació

Els bacteris poden tornar-se resistents només per estar sotmesos a una concentració d'antibiòtic a la qual no moren, o és necessari que hi intervinguin fenòmens de parasexualitat bacteriana o una mutació?

Concretament, **el bacteri *Escherichia coli*, es tornarà resistent a l'ampicil·lina<sup>6</sup> tant si està sotmès a una concentració d'aquest antibiòtic a la qual no mor com si li introduïm un plasmidi de resistència?**

## 2. Hipòtesi

**Potser no es tornarà resistent a l'ampicil·lina pel fet d'estar sotmès a aquest antibiòtic però sí que s'hi tornarà si li introduïm un plasmidi de resistència.**

La teoria Lamarckiana proposa que si un individu canvia de medi, aniran canviant les seves facultats fins a adaptar-se completament al nou hàbitat. Per tant, seguint la idea Lamarckiana el bacteri *E. coli* també es tornarà resistent en un medi amb ampicil·lina, s'adaptarà i si augmentem la concentració no morirà.

Però la teoria de l'evolució actual, el Neodarwinisme, defensa que els individus d'una mateixa espècie presenten variabilitat, a causa de les mutacions i la recombinació genètica durant la meiosi, i que el medi selecciona els més aptes. Per tant, si cultivem *E. coli* a una concentració molt baixa a la qual no morin, no es tornaran resistents i a l'augmentar la concentració, moriran per selecció natural. Però si afegim un gen de resistència a l'ampicil·lina, provocarem un canvi en el seu DNA i, com a conseqüència, seran més aptes en un medi amb antibiòtic i sobreviuran.

---

<sup>6</sup> Amb l'antibiograma realitzat s'ha observat, tal i com s'explica més endavant, que la soca d'*E. coli* emprada és sensible a l'ampicil·lina.

### 3. Material

- 16 plaques de Petri estèrils de 60 mm.
- 3 tubs d'Eppendorf de 2 ml.
- Nanses de sembra esterilitzades.
- 2 gradetes d'espuma pels tubs.
- Pipetes estèrils d'1 ml.
- Olla per a l'aigua calenta.
- Vas de precipitats d'1 L.
- Vas de precipitats de 250 ml.
- 20 µg de plasmidi pGLO liofilitzat.
- Soca de bacteris *E. coli*.
- 10 ml caldo nutritiu LB. Composició: 10 g triptona, 5 g extracte de llevat, 10 g NaCl, 1000 ml d'aigua destil·lada. El pH està ajustat a 7.2.
- 2 vials de 30 mg d'ampicil·lina liofilitzada.
- 600 mg d'arabinosa liofilitzada.
- 20 g d'agar LB.
- 15 ml de solució de transformació (CaCl<sub>2</sub> 50 Mm, pH 6.1).
- 250 ml d'aigua destil·lada.
- Glaçons de gel.
- Amoxicil·lina (750 mg).
- Amoxicil·lina/Àcid Clavulànic (500 mg/125 mg).
- Eritromicina (500 mg).
- Cronòmetre.
- Bolígraf de llum UV.
- Termòmetre.
- Microones.
- Retoladors permanents.
- Estufa de cultiu.
- Recipient de vidre pel gel.

## 4. Procediment

Per comprovar la meua hipòtesi, he realitzat tres experiments:

Primer, un antibiograma per comprovar si la soca de bacteris *E. coli* és sensible a diferents antibiòtics, entre ells l'ampicil·lina, que és l'antibiòtic al qual es pretén tornar resistent.

Segon, he cultivat els bacteris sensibles en un medi amb una concentració molt baixa d'ampicil·lina i els que han sobreviscut els he tornat a cultivar en un medi amb una concentració per sobre de la mínima inhibidora, per tal de comprovar si s'havien tornat resistents. És a dir, l'exposició a l'antibiòtic provocaria la resistència (lamarckisme).

Finalment, he realitzat una transformació bacteriana. He introduït dins dels bacteris sensibles el plasmidi pGLO, que com he dit anteriorment, conté un gen de resistència a l'ampicil·lina. Amb això, he volgut estudiar si l'adquisició de la resistència és independent de la presència d'antibiòtic al medi (neodarwinisme).

El treball realitzat al laboratori està explicat pas a pas i per orde cronològic a l'annex 1.

## 5. Resultats i discussió dels resultats

Tot seguit exposo els resultats obtinguts a cada experiment.

### 5.1. Experiment 1: antibiograma

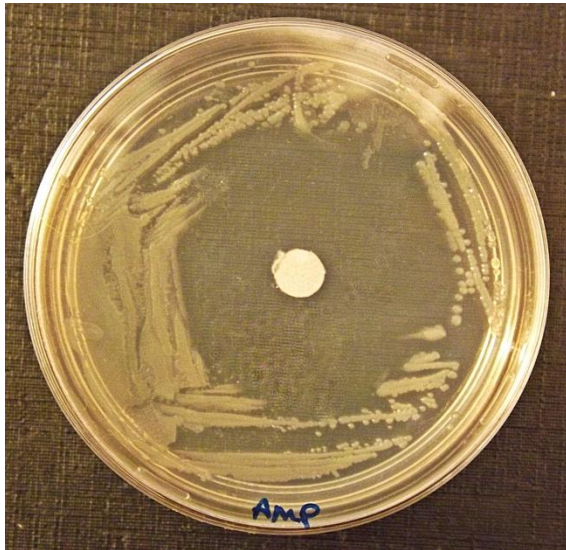
En primer lloc estudiem les dos plaques LB control (sense antibiòtic):



**FIG.31:** Placa LB 1 control antibiograma.

Observem que les colònies són rodones i de color crema, és a dir, presenten les característiques pròpies d'*E. coli* i per tant les plaques no estan contaminades.

En segon lloc observem les plaques LB antibiograma (amb antibiòtic):



**FIG.32:** Placa LB ampicil·lina antibiograma.



**FIG.33:** Placa LB amoxicil·lina antibiograma.



**FIG.34:** Placa LB amoxicil·lina+ àcid clavulànic antibiograma.



**FIG.35:** Placa LB eritromicina antibiograma.

A continuació, anotem els resultats obtinguts en la taula següent:

Bacteri	Antibiòtic	Diàmetre de l'halo d'inhibició	Estàndard de sensibilitat	Resultat
<i>E. coli</i>	Ampicil·lina	31 mm	≥ 17 mm	Sensible
<i>E. coli</i>	Amoxicil·lina	25 mm	≥ 15 mm	Sensible
<i>E. coli</i>	Amoxicil·lina + àcid clavulànic	30 mm	≥ 18 mm	Sensible
<i>E. coli</i>	Eritromicina	0 mm	≥ 21 mm	Resistent

Tot i que la soca d'*E. coli* estudiada és sensible a l'ampicil·lina, l'amoxicil·lina i l'amoxicil·lina + àcid clavulànic, per l'experiment s'utilitzarà l'ampicil·lina ja que el plasmidi emprat en l'experiment 3 conté el gen de resistència a aquest antibiòtic.

## 5.2. Experiment 2: lamarckisme

A continuació analitzem les plaques LB amb ampicil·lina a les concentracions de 4, 8 i 16 µg/ml i les sembres posteriors a concentracions elevades.

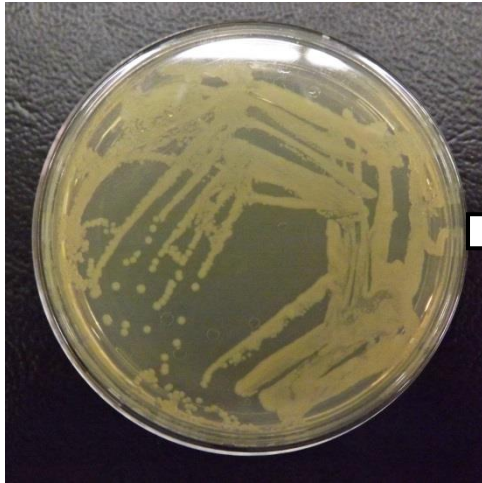
Observem que en els casos de les plaques de 4, 8 i 16 µg/ml, tal i com esperàvem, hi ha creixement bacterià ja que les concentracions d'ampicil·lina emprades estan per sota de la concentració mínima inhibidora.



FIG.36: Placa LB/Amp 4 µg/ml.



FIG.37: Placa LB/Amp amb la sembra dels bacteris de la placa LB/Amp 4 µg/ml.



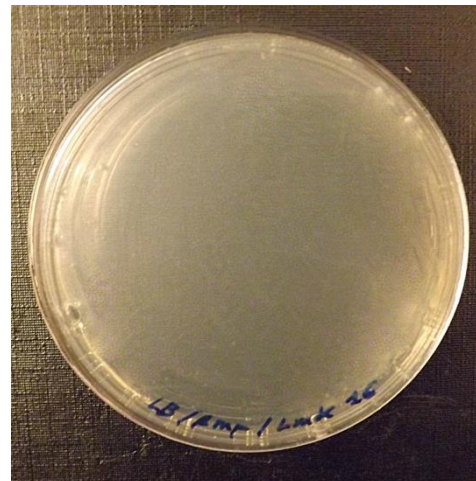
**FIG.38:** Placa LB/Amp 8 µg/ml.



**FIG.39:** Placa LB/Amp amb la sembra dels bacteris de la placa LB/Amp 8 µg/ml.



**FIG.40:** Placa LB/Amp 16 µg/ml.



**FIG.41:** Placa LB/Amp amb la sembra dels bacteris de la placa LB/Amp 16 µg/ml.

Finalment, observem que si sembrem els bacteris de les plaques amb concentracions baixes d'ampicil·lina en plaques a una concentració per sobre de la mínima inhibidora moren. Per tant, no s'han tornat resistents per estar sotmesos a concentracions baixes de l'antibiòtic.

### 5.3. Experiment 3: transformació bacteriana

Finalment observem els resultats obtinguts en la transformació bacteriana.

Comparem les plaques LB/Amp/Ara +pGLO (amb presència del plasmidi) i les plaques LB/Amp/Ara -pGLO (sense plasmidi):

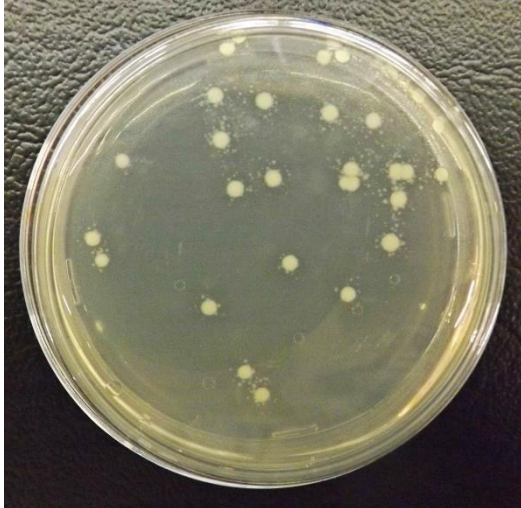


FIG.42: placa LB/Amp/Ara +pGLO.



FIG.43: placa LB/Amp/Ara -pGLO.

Observem que a la placa de Petri amb ampicil·lina que contenia el plasmidi (FIG.42) han crescut colònies, per tant, són bacteris resistents a aquest antibiòtic. No han crescut a les plaques en què no hi ha hagut transformació (FIG.43), és a dir, on no s'ha afegit el plasmidi, per tant, els bacteris continuen essent sensibles a l'ampicil·lina.

A continuació comprovem si la resistència l'han adoptat a causa del plasmidi:

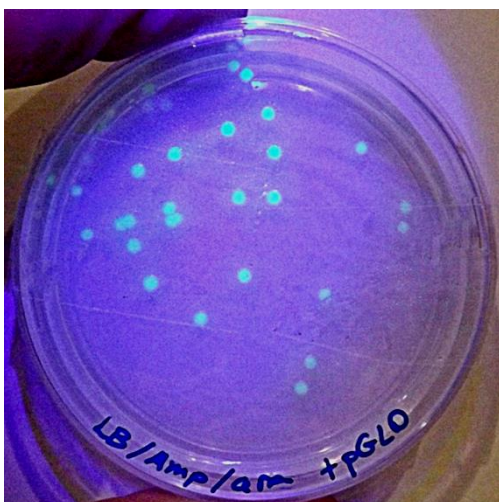


FIG.44: placa LB/Amp/Ara +pGLO sota llum UV.

Contemplem que sota la llum UV les colònies presenten bioluminescència. Com he dit anteriorment, el plasmidi contenia, entre d'altres, els gens de la Lactamasa beta, que codifica per a la producció de  $\beta$ -lactamasas i el de la GFP, que farà que els bacteris siguin verd fluorescent.

Per tant, les soques que han sobreviscut en un medi amb ampicil·lina són les que han adquirit el plasmidi. Així doncs, presenten fluorescència sota la llum UV i produeixen  $\beta$ -lactamasas, que els fa resistents a l'ampicil·lina.

Finalment, he tornat a sembrar les colònies resistents en una nova placa amb ampicil·lina:



**FIG.45:** ressembla placa LB/Amp/Ara +pGLO sota llum UV.

Observem que les colònies filles segueixen presentant el plasmidi, és a dir, també són resistents a l'ampicil·lina.

## 6. Conclusions

Un cop realitzats els experiments i analitzats els resultats podem acceptar la hipòtesi plantejada inicialment sobre la soca *E.coli*:

**“Potser no es tornarà resistent a l'ampicil·lina pel fet d'estar sotmès a aquest antibiòtic però sí que s'hi tornarà si li introduïm un plasmidi de resistència”.**

Per tant, queda descartada la idea lamarckiana i s'accepta la idea neodarwinista.

Com ja he dit anteriorment, els resultats de l'antibiograma d'*E. coli* (bacteri gramnegatiu) són que és sensible a tots els antibiòtics emprats excepte l'eritromicina. Aquest és un antibiòtic efectiu en grampositius, tot i que també afecta els gramnegatius, però a concentracions molt elevades. Per tant, podria ser que presentés resistència perquè la concentració d'antibiòtic no era suficient. En el cas de que una persona presentés una infecció produïda per aquest soca, se li podrien subministrar qualsevol dels antibiòtics estudiats, però si s'administrés eritromicina, hauria de ser a dosis molt altes, que serien perjudicials pel pacient.

Pel que fa a l'experiment del lamarckisme, els bacteris no s'han tornat resistents a l'estar sotmesos a una concentració baixa d'ampicil·lina, però sí que han adoptat la resistència a aquest antibiòtic a l'introduir en el seu genoma un plasmidi de resistència (transformació).

A més, al tornar a sembrar les colònies resistents s'observa que els descendents també contenen el plasmidi i, per tant, sobreviuen en un medi amb ampicil·lina.

Finalment, es pot concloure que l'aparició de microorganismes resistents als antibiòtics es dona per canvis en el seu DNA provocats per mutacions o per l'adquisició de nous elements genètics mòbils com els plasmidis, independentment de la presència d'antibiòtic en el medi. Malgrat això, és l'exposició a aquests fàrmacs el que proporciona un avantatge a les cèl·lules amb el fenotip acabat d'adquirir.

La realització d'aquest experiment em porta a plantejar-me una nova pregunta: El bacteri *Escherichia coli* resistent a l'ampicil·lina també presentarà resistència davant de la penicil·lina o derivats?

Si realitzés un experiment per respondre a aquesta pregunta, la meua hipòtesi seria afirmativa. Totes les penicil·lines presenten un anell beta lactàmic que pot ser destruït per l'enzim  $\beta$ -lactamasa. Com que la soca de bacteris resistent de què dispo conté aquests enzims, suposo que no només serà resistent a l'ampicil·lina sinó que també ho serà davant de tots els antibiòtics que presentin aquesta estructura.

## CONCLUSIÓ GENERAL

Els antibiòtics constitueixen un ampli i heterogeni grup de medicaments, la utilització dels quals, tant en medicina com en veterinària, ha suposat un progrés extraordinari per a la vida sanitària de les persones. Però com amb tots els fàrmacs, els antibiòtics han de ser utilitzats correctament i en les circumstàncies adequades a fi d'obtenir el major nivell d'eficàcia i evitar, en la mesura del possible, el sorgiment i propagació de resistències.

En la part experimental, on seguint rigorosament el mètode científic, he pogut arribar a la conclusió de que els bacteris no es tornen resistents per estar sotmesos a l'acció d'un antibiòtic, sinó que ho fan a través dels mecanismes de parasexualitat bacteriana o bé, gràcies a una mutació. Tot i això, els antibiòtics afavoreixen la supervivència i reproducció de les soques resistents.

Així doncs, dins d'una població de bacteris sensibles pot sorgir, a l'atzar, una mutació que proporcioni a un bacteri la capacitat de resistir sota l'acció d'un antibiòtic. Aquest pot transferir el gen de resistència a la resta de bacteris, els quals es tornaran resistents.

Els bacteris resistents són seleccionats positivament sota l'acció del propi antibiòtic. Per tant, si es sotmet una població de bacteris on hi ha mutants resistents a l'acció d'un antibiòtic disminuirà el nombre de bacteris sensibles, però els bacteris resistents sobreviuran i poden arribar a substituir tota la població bacteriana (procés de selecció).

En les condicions òptimes (tria de l'antibiòtic i tractament adequats) els processos de selecció tenen una transcendència clínica menor que amb el mal ús d'aquests. Per tant, l'abús en la utilització dels agents antibacterians ha originat una forta pressió selectiva que ha afavorit un increment de les poblacions resistents.

Actualment, la velocitat d'aparició de resistències bacterianes és major que l'aparició de nous antibiòtics. Com a conseqüència, s'observa la reaparició de malalties que fins al moment semblaven estar eradicades en els països desenvolupats.

En els països en vies de desenvolupament la situació encara és més preocupant. Per exemple, segons un article publicat el 18 de desembre de 2014 a l'edició internacional de *The New York Times*, a l'Índia dos milions de persones emmalalteixen cada any per culpa dels bacteris resistents als antibiòtics i d'aquestes, 23.000 moren. A l'Hospital Sir Ganga Ram de Nova Delhi, un dels centres sanitaris privats més prestigiosos de l'Índia, gairebé el 100% dels nadons que són derivats a aquest hospital presenten infeccions multi resistents.

Aquest treball m'ha permès aprofundir en un tema d'actualitat i d'interès com són les resistències bacterianes. A més, he assolit els objectius que em plantejava inicialment i he adquirit coneixements que fins al moment no tenia. El treball m'ha requerit molta dedicació i he hagut de superar algunes dificultats a l'hora de realitzar la part experimental. Però els resultats obtinguts han fet que l'esforç hagi valgut la pena.

Finalment, per tal de donar una visió més completa del tema, vaig sol·licitar una entrevista al Dr. Joaquim Ruiz Blazquez, adscrit al Centre de Recerca de Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), de la qual adjunto un extracte com a annex 2.

# BIBLIOGRAFIA

## 1. Llibres

Brock, T. D., Madigan, M. T. & Guerrero, R. (2009). *Brock, biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Educación.

Rius Bofill, N., Berlanga Herranz, M. & M. Marqués Villavecchia, A. (2006). *Anàlisi microbiològica i higiene dels aliments*. Gráficas Rey, S.L. ed. Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.

Neumayer, P. (2000). *Antibióticos naturales*. Barcelona: Los Libros de Integral.

## 2. Articles

Levy, S. B., (1998). “La resistencia contra los antibióticos”. *Investigación y ciencia*, Mayo, pp. 14-21.

Baquero, F., Jesús, B. & Martínez, J. L., (2002). “Mutación y resistencia a los antibióticos”. *Investigación y ciencia*, Diciembre, pp. 72-78.

Giraldo Suárez, R., (2004). “Resistencia a los antibióticos. Plásmidos”. *Investigación y ciencia* , Setembre, pp. 33-36.

Nicolau, K. C. & Boddy, C. N. C., (2001). “Desarrollo de resistencia contra los antibióticos”. *Investigación y ciencia*, Juliol, pp. 6-12.

Cartelle Gestal, M., (2013). “Vencer la resistencia a los antibióticos”. *Investigación y ciencia* , Maig, pp. 15-17.

Rojas López, M., (2010). “Genética de la Tuberculosis”. *Investigación y ciencia* , Gener, pp. 28-36.

Sanz Herrero, F. & Blanquer Olivas, J., (2010). “Resistencias antibióticas en la neumonía”. *Investigación y ciencia* , Gener, pp. 9-10.

T. Walsh, C. & A. Fischbach, M., (2009). “Nuevas tácticas contra bacterias resistentes”. *Investigación y ciencia* , Setembre, pp. 22-29.

De Benito, E., (2014). "Fleming tenía razón". *El País*, 1 Maig, pp. 30-31.

García Migura, L., (2012). "Los "Superbugs" o bacterias multiresistentes". *CReSAPIENS*, Issue 2, pp. 10-11.

Gardiner, H., (2014). "Las bacterias invencibles". *The New York Times*, 18 Diciembre, pp. 1-4.

### 3. Documents electrònics

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance* [PDF]. [Data de consulta: 10 de Juliol de 2014].

<[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)>

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. *Agentes antimicrobianos y microorganismos* [PDF]. [Data de consulta: 5 de Setembre de 2014].

<[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/a3agentes\\_antimicrobianos\\_y\\_microorganismos.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/a3agentes_antimicrobianos_y_microorganismos.pdf)>

SEIJA, V. & VIGNOLI, R. *Principales mecanismos de resistencia antibiótica* [PDF]. [Data de consulta: 9 de Setembre de 2014].

<<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>>

EARS-NET. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010* [PDF]. [Data de consulta: 15 d'octubre de 2014].

<[http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111\\_SUR\\_AMR\\_data.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_AMR_data.pdf)>

EARS-NET. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012* [PDF]. [Data de consulta: 15 d'octubre de 2014].

<<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>>