

ANTAGONISMUL MICROBIAN. ANTIBIOTICELE. BACTERIOCINELE



COMUNITĂȚILE MICROBIENE. RELAȚIILE DINTRE MICROORGANISME ÎN COMUNITĂȚI



- În natură microorganismele viețuiesc în cadrul asociațiilor, care includ bacterii, micete, alge, protozoare ș.a. Astfel de asociații se întâlnesc în variate habitate naturale: apă, sol, pe plante, pe suprafața și în corpul uman și animal.
- **BIOTOP** – spațiu cu condiții de viață particulare (conjunctiva, mucoasa intestinală, orofaringe, vagin, tegument, etc), populat și transformat de asociații de ființe vii.
- **MICROBIOCENOZĂ** (comunitate microbiană) – asociații microbiene ce populează un biotop.

- Microorganismele prezente într-un biotop particular constituie *microflora* acestui habitat (m/f cutanată, intestinală, etc)
- Aceasta joacă un rol important în protejarea gazdei față de o invazie microbiană ulterioară, acționând prin următoarele mecanisme:
 - competiția pentru aceiași nutrienți;
 - competiția pentru aceiași receptori de pe celulele gazdei;
 - producția de bacteriocine; vitamine;
 - producerea de acizi grași volatili sau alți metaboliți;
 - stimularea continuă a sistemului imun;
 - stimularea producerii unor factori imuni de protecție (anticorpii naturali).



- Între microorganismele unui biotop se pot stabili relații:
 - Indiferente** (neutralism)
 - Favorabile** (comensalism/satelitism, simbioză/mutualism, sinergism)
 - Defavorabile** (parazitism, antagonism)
- Antagonism** – o specie inhibă sau omoară altă specie prin mecanisme specifice sau nespecifice



Mi/o care manifestă activitate inhibitoare – **antagonist (A)**, mi/o care suferă – **concurrent (C)**.

Antagonism nespecific:

- Antagonistul este mai activ, utilizând nutrienții, oxigenul
- Antagonistul produce metaboliți toxici (acizi, indol, H₂S, amoniac, peroxid, etc)

Antagonism specific – antagonistul produce substanțe cu acțiune specifică asupra unui sau mai multor concurenți (antibiotice, bacteriocine).



Efectul acțiunii unui antagonist asupra concurrentului poate fi *bacteriostatic* sau *bactericid* (uneori bacteriolitic).

Utilizarea practică a antagonismului microbian:

1. Pentru depistarea mi/o – producători de antibiotice (micete, actinomicete, bacterii)
2. Pentru obținerea produselor biologice curative de origine microbiană (probiotice, eubiotice/sinbiotice): Lactobacterina, Colibacterina, Bifidumbacterina, Bificol, etc
3. Crearea biocenozelor favorabile organismului



- **Probioticele** sunt preparate ce conțin bacterii vii sau substanțe de origine microbiană care, introduse pe cale naturală, manifestă efecte benefice (fiziologice, biochimice și imune) pentru organismul-gazdă prin stabilizarea și optimizarea funcțiilor microflorei normale.
- **Prebioticele** sunt preparate ce conțin un ingredient alimentar nedigerabil care stimulează selectiv creșterea și activitatea unui număr limitat de bacterii rezidente ale microflorei normale intestinale.
- **Sinbioticele** sunt preparate obținute în urma combinării raționale dintre probiotice și prebiotice.

- **ANTIBIOTICE (AB)**– produse de origine naturală (microbiană, animală sau vegetală), derivați semi-sintetici sau produse sintetice care inhibă sau omoară selectiv unele mi/o sau/și celule tumorale, fără a exercita ca regulă efecte toxice asupra macroorganismului.
- **Clasificarea AB**
 - După efectul asupra celulei**
 - Bacteriostatic (tetraciclina, cloramfenicol...)
 - Bactericid (streptomicina, polimixina)
 - Bacteriolitic (peniciline, cefalosporine)

- De origine microbiană (**bacitracina** din *Bacillus subtilis*, **gramicidina** din *Bacillus brevis*, **polimixina** din *Bacillus polymyxa*)
 - De origine vegetală – fitoncidele (alicina, rafanină, imanină)
 - De origine animală (lizozimul – din albuș de ou, ercolina – din oase de pește, eritrina – din masă eritrocitară, splenocitina – din splină)
- IV. După compoziția chimică** (beta-lactamice, macrolide, aminoglicozide, fenicoli, polipeptide, poliene, sulfamide, chinolone și fluorochinolone, nitrofurani, etc)

METODELE DE STUDIU AL ANTAGONISMULUI

- În mediu solid** (metoda tranșeei) – antagonistul se însămânțează în centrul cutiei, concurenții – perpendicular. Termostat 24h. Aprecierea – după dimensiunea zonei de inhibiție a creșterii culturii concurentului.
- În mediu semisolid** – I strat – antagonistul, II strat – concurentul. Termostat 24h. Aprecierea – zonă clară între straturi.
- Însămânțarea în mediu lichid** (BP) a unui număr egal de A și C. După 24 h de incubație se reînsămânțează 0,1 ml pe placa cu geloză. Se compară numărul coloniilor de A și C.

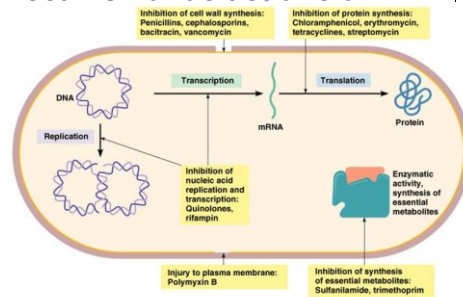
II. După spectrul de acțiune

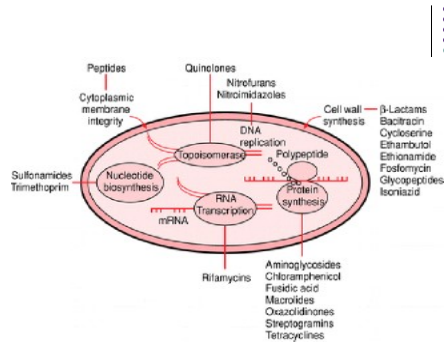
- AB cu spectru restrâns (îngust) de acțiune (AB anti-G+, anti-G-, anti-tuberculoase, anti-micotice, anti-tumorale, etc)
- AB cu spectru larg de acțiune (G+ și G-)

III. După produsent (origine)

- De origine fungică (peniciline, cefalosporine,...)
- Din actinomicete (aminoglicozide, macrolide, cloramfenicol, etc)

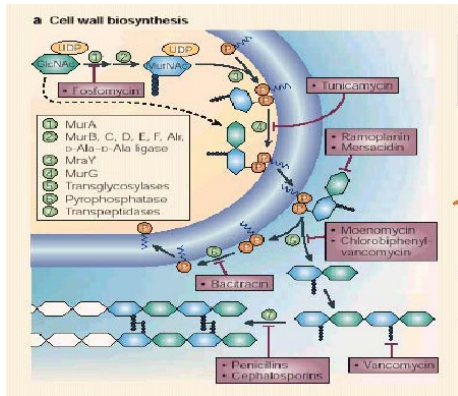
Mecanismul de acțiune al AB





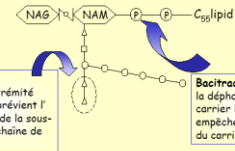
Mecanismul de acțiune al AB

1. AB cu acțiune asupra sintezei peretelui celular (dereglaarea sintezei peptidoglicanului)
 - Beta-lactamice (peniciline, cefalosporine). Dereglează procesul de sinteză a PG, inhibând transpeptidazele (ținta - PFP)
 - Vancomicina, teicoplanina (blochează transferul pentapeptidului din MCP spre peretele celular)
 - Bacitracina (blochează reciclarea moleculelor de transport transmembranar - bactoprenol)
 - Fosfomicina (blochează piruviltransferaza, implicată în sinteza acidului N-acetil muramic)
- Efectul acestor AB este bactericid/litic, doar celulele metabolic active sunt omorâte. Nu afectează celulele eucariote (lipsa PG).



Inhibiția de la sinteză de la paroi bacteriană

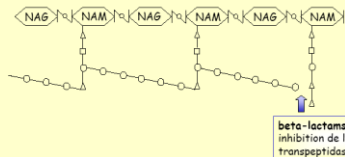
Sinteză de la sub-unită de peptidoglican atașată de un 'carrier' lipidic sau se în de la membrana citoplasmică



Bacteriologie Medicală - M. Struelens - 3e Candidatură Medicină și 2e Candidatură Științe Biomédicale

Inhibiția de la sinteză de la paroi bacteriană

Incorporarea de sub-unități pe scheletul de peptidoglican în formare, la nivelul de la membrana citoplasmică (fața externă)



Bacteriologie Medicală - M. Struelens - 3e Candidatură Medicină și 2e Candidatură Științe Biomédicale

2. AB cu acțiune asupra ME și a MCP

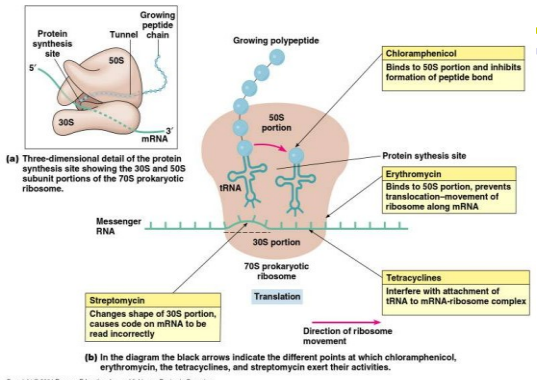
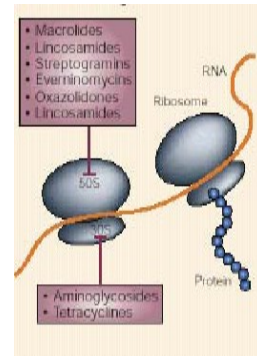
- AB polipeptidice (polimixina, colistina). Se fixează pe membrane bacteriene (în special pe lipidul A (ME la bacterii G-), provocând dezorganizarea lor. Efect bactericid.
- AB polienice (nistatina, levorina, amfotericina B, etc). Se fixează pe steroli MCP ale micetelor, perturbând respirația și dezorganizând MCP (permeabilitate excesivă și moartea celulei).

Aceste AB acționează și asupra celulelor în repaus. Relativ toxice, în special nefro.

3. AB cu acțiune asupra ribozomilor

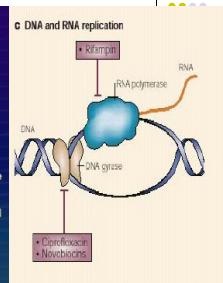
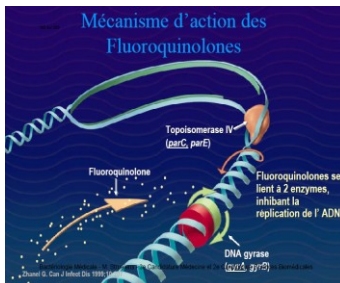
- 30S (aminoside: streptomycină, kanamicină, gentamicină, tobramicină, amikacină; tetracicline)
- 50S (cloramfenicol, triamfenicol; macrolide: eritromicină, oleandomicină; lincosamide: clindamicină, lincomicină).

Se leagă pe receptori specifici de pe subunitățile 30S sau 50S, perturbând sinteza proteică (inhibiția transpeptidazei, a translocăției peptidelor, etc). Rezultă inhibiția sintezei proteice sau sinteza proteinelor nefuncționale. Efectul este bacteriostatic (aminosidele – bactericid), doar asupra celulelor active metabolic.

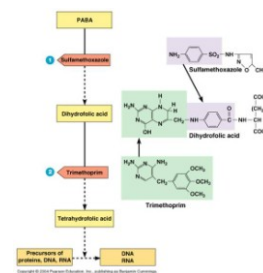


4. AB cu acțiune asupra acizilor nucleici

- *Rifampicina* – inhibă ARN-polimeraza ADN-dependentă. Rezultă stoparea sintezei ARNm
- *Novobiocina*, *Chinolonele* (acidul nalidixic, ciprofloxacina, ofloxacina) – blochează activitatea topo-izomerazelor, intervenind în conformația ADN-ului. Efect bactericid.



- *Sulfamidele și trimetoprimul* perturbă sinteza acidului folic și foliaților (cofactori în sinteza AN). Activitate bacteriostatică.

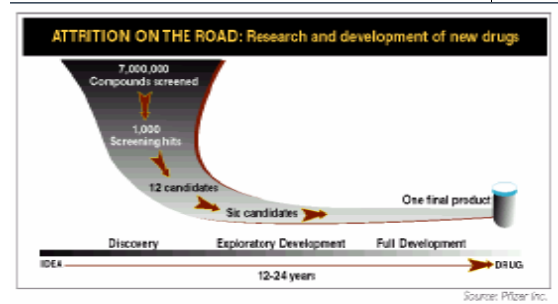


• Producerea AB

1. Metoda biologică
2. Metoda sintetică
3. Metoda semi-sintetică

Etapele metodei biologice:

1. Cultivarea tulpinilor-producente (ex.: *Penicillium notatum*, *Actinomyces griseum*, etc) în mediu lichid adecvat
2. Extragerea AB
3. Purificarea și concentrarea AB
4. Controlul toxicității
5. Determinarea activității AB



Activitatea AB se măsoară în unități de masă (g, mg, μ g) sau de acțiune (UA).

1 UA – cantitatea minimală de AB care inhibă creșterea unei tulpini de referință în condiții standard.

Penicilina – 1UA = 0,6 μ g de substanță pură

Cerințele față de AB:

- Toxicitate selectivă
- Efect terapeutic cu doze minime
- Activitate de lungă durată
- Spectru restrâns de acțiune
- Să fie solubile și absorbite ușor
- Să nu provoace efecte secundare
- Să nu se dezvolte rezistența contra AB
- Să fie ieftine

Sensibilitatea microbilor la AB

În funcție de rezultatele clinice, bacteriile se divizează în 3 clase: *sensibile la AB (S)*, *rezistente (R) și intermediare (I, moderat sensibile)*.

Tulpinile S – efectul terapeutic este obținut cu doze terapeutice uzuale

Tulpinile R – efectul terapeutic nu poate fi obținut cu doze terapeutice

Tulpinile I – succesul terapeutic este imprevizibil. Ar fi posibil cu doze mari sau la administrarea locală a AB.

Fiecare tulpină izolată manifestă sensibilitate particulară. Ea poate fi studiată în laborator pentru determinarea profilului de sensibilități al acestei tulpini, ceea ce constituie o **antibiogramă**.

Rezultatele testelor de sensibilitate permit medicului să claseze tulpinile bacteriene după categoriile terapeutice (S, R, I), uneori sunt utile în identificarea tulpinilor.

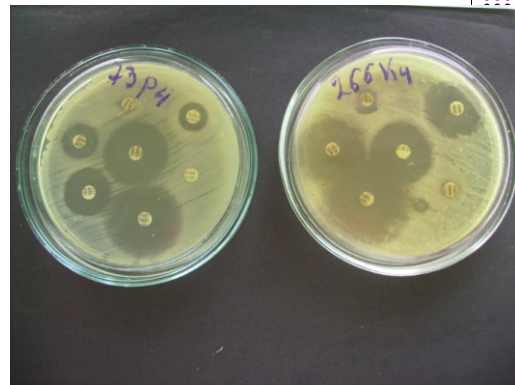
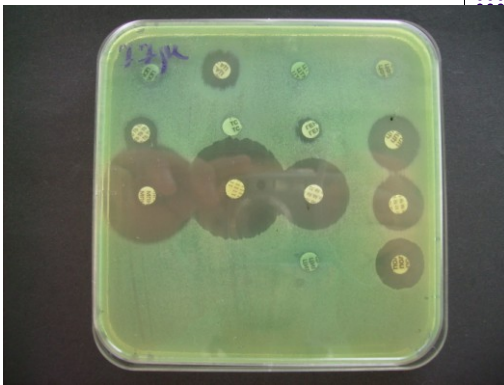
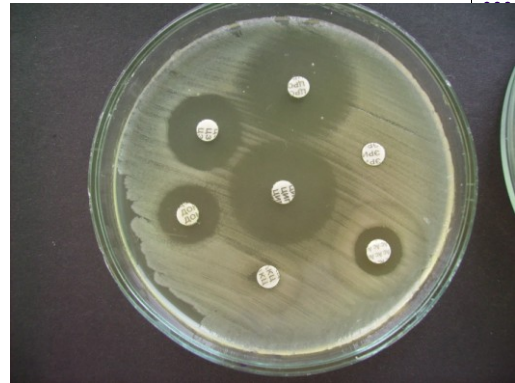
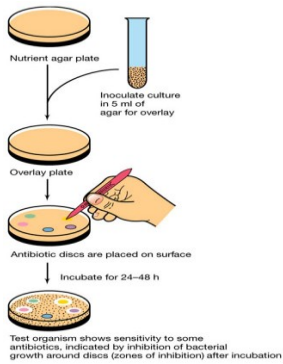
Testarea sensibilității bacteriilor la AB

Metoda difuzimetrică (rondelelor). Utilizată uzual în infecții banale.

Condiții: mediu standard, concentrație standardă de mi/o (10^5 /ml), rondel/discuri (comprimate) cu % standarde de AB, condiții standard.

Mediul este inoculat cu suspensia bacteriană. După uscare în termostat se aplică rondelurile – 24h, 37 C.

Lectura – diametrul zonei de inhibiție a creșterii culturii bacteriene este comparat cu diametrele standarde pentru fiecare AB. Valori sub acest diametru – tulpina este R, dacă este depășit – S.

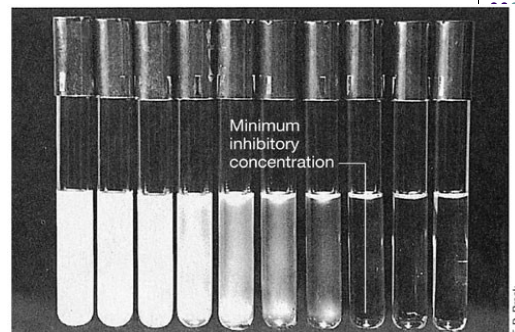


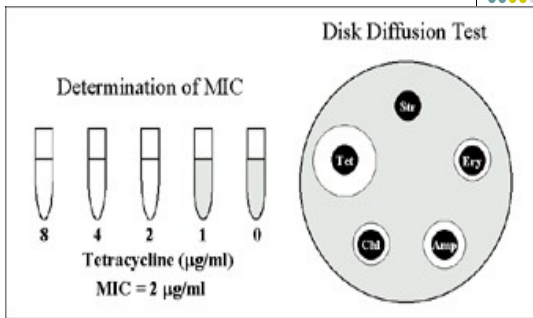
• Metoda diluțiilor

Într-un șir de tuburi cu 1 ml BP se efectuează diluția AB (256 UA, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, etc). Se adaugă în fiecare tub (cu excepția celui martor) 0,1 ml de suspensie bacteriană 10^5 /ml. Termostat - 24h.

Lectura – cea mai mică doză de AB care inhibă creșterea culturii după 24h de incubare (mediu clar) constituie **Concentrația Minimă de Inhibiție (CMI)** a AB pentru tulpina testată.

CMI măsoară efectul bacteriostatic.





Concentrația Minimă Bactericidă (CMB) –

cantitatea minimă de AB care omorâă 99,9% din inoculum după 18h de incubare.

Determinarea CMB – din ultimele tuburi fără creștere se repică 0,1 ml de mediu pe placa cu geloză. După 24h se compară numărul celulelor ce au supraviețuit cu nr inițial de bacterii (10^5 /ml).

Corelația dintre studii *in vitro* și rezultate *in vivo*

În studii *in vitro* parametrii (densitatea suspensiei bacteriene, concentrația AB, etc) nu se modifică în timp. *In vivo*, la pacienți, concentrația AB variază în timp și în funcție de țesut.

Pentru a stabili dacă tulpina izolată este sensibilă sau rezistentă la un AB se cere cunoașterea **Concentrației Terapeutice (CT)** (cantitatea de AB prezent în focarul infecțios în cursul tratamentului cu doze terapeutice) a fiecărui AB testat.

- **Tulpini Sensibile** – CMI/CT <1, ex.: 2/8, 2/16 - efect terapeutic posibil cu doze uzuale
 - **Tulpini Rezistente** – CMI/CT >1, ex.: 8/2, efect terapeutic imposibil
 - **Tulpini Intermediare** – CMI/CT=1, efect terapeutic imprezizibil. Pot fi utilizate doze maxime de AB sau administrarea lor locală
- Testarea CMI / CMB este indicată în tratamentul infecțiilor grave : meningite, septicemii, endocardite, infecții cronice sau la persoane cu imunosupresie.

Monitorizarea (supravegherea) tratamentului cu AB. Verificarea eficacității antibioterapiei.

1. **Determinarea concentrațiilor umorale sau tisulare ale AB**

Indicații:

- Utilizarea unui AB toxic
- În caz când bolnavul suferă de deficiențe metabolice sau excretoare (renale, hepatice)

Se compară concentrațiile obținute cu CMI a antibioticului testat (sau cu CT).

2. Studiul activității inhibitorii a lichidelor biologice (NEI)

Indicații: infecții grave care nu răspund rapid la tratament.

Efectuarea: la diluții duble (1/2, 1/4...) ale lichidului examinat (ser, LCR, urină) se adaugă suspensia bacteriană (din tulpina izolată de la bolnav).

Lectura: după 24h de incubație la 37 °C se apreciază diluția maximă cu efect bacteriostatic/cid.

NEI ≥1:8 reflectă eficiența antibioterapiei



Rezistența mi/o la antibiotice

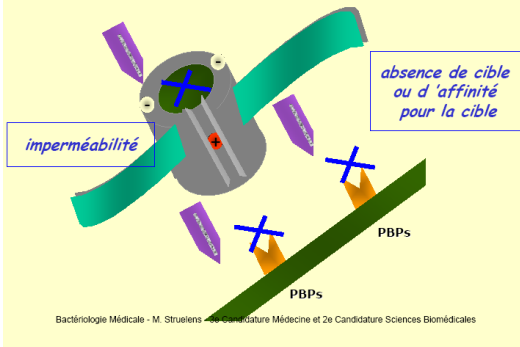
Cauzele:

1. Factori genetici, proprii bacteriilor
2. Factori ce favorizează selecția și difuzarea tulpinilor bacteriene rezistente

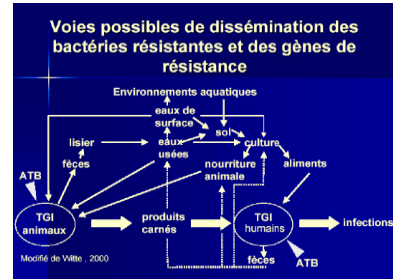
Tipurile de rezistență:

1. **Naturală, ereditară, de specie**, prezentă la toți membrii unei specii sau gen
 - *lipsa țintei* – ex.: micoplasme, micete;
 - *imposibilitatea de a atinge ținta* – ex.: Mycobacterium (cerurile, lipidele împiedică pătrunderea AB în citoplasmă);
 - *bacteriile nu efectuează procesul inhibat de AB* – ex.: acidul folic este preluat din mediu – rezistență la sulfamide

Résistance constitutive aux β -lactamines



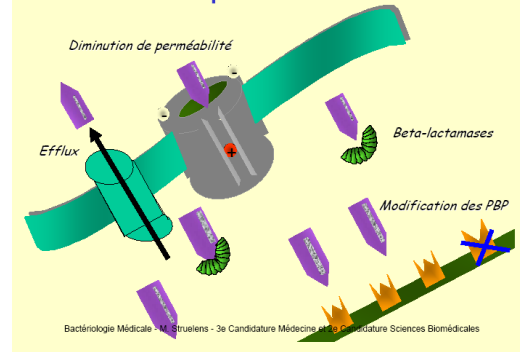
2. **Achiziționată, dobândită**, afectează tulpinile unei specii sensibile. Depinde de acțiunea de selecție exercitată de AB utilizate în tratament, urmată de răspândirea ei (între bacterii, interuman, transmisie de origine animală).

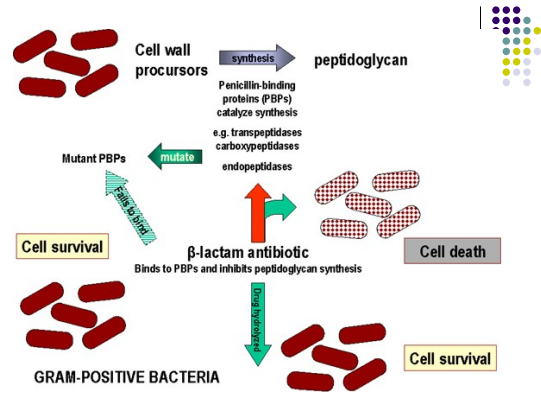
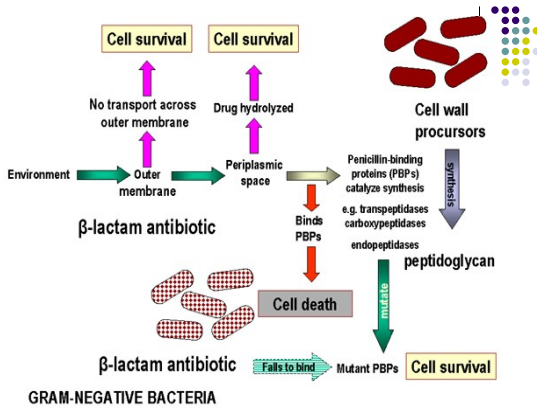


Mecanismele rezistenței dobândite:

- Diminuarea permeabilității membranare
- Modificarea țintei moleculare
- Eliminarea excesivă a AB
- Inactivarea enzimatică a AB, care poate fi hidrolizat (penicilinază, cefalosporinază) sau modificat structural (acetilaze, adenilaze, fosforilaze), etc.

Résistances acquises aux β -lactamines





Rezistența dobândită se poate manifesta **fenotipic** (bacteriile în faza de repaos, formele "L" de bacterii) sau **genetic** (genotipic)

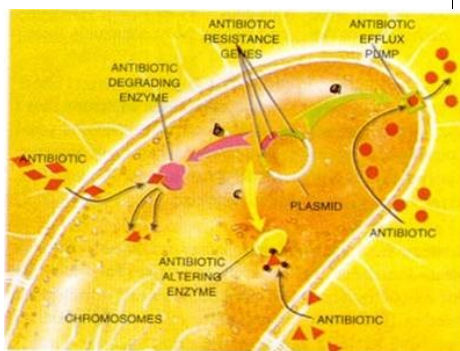
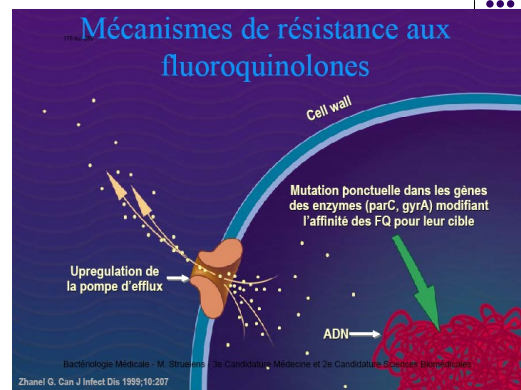
Rezistența genetică poate fi:

- **Cromozomială**, determinată de mutații (10%)

Mecanisme: modificarea țintei moleculare, diminuarea permeabilității membranare

- **Plasmidică**, epidemică, realizată prin transfer de gene prin intermediul plasmidelor R (poate fi rezistență multiplă).

Mecanisme: inactivarea enzimatică, modificarea țintei, substituția sau supraproducția țintei, excreție excesivă a AB.



Prevenirea rezistenței

1. Supravegherea epidemiologică a tulpinilor rezistente
2. Politică strictă de prescriere a AB
3. Respectarea dozelor terapeutice corecte și a timpului de tratament necesar
4. Asocierea AB cu mecanisme de acțiune diferite
5. Prescrierea AB care nu sunt sensibile la beta-lactamaze, utilizând inhibitori (acidul clavulanic, sulbactamul, tazobactamul). Ex.: augmentina – amoxicilina+acid clavulanic
6. Reciclarea AB
7. Producerea AB noi



Efectele negative ale antibioticoterapiei

1. Efect toxic (streptomycină – surditate, cloramfenicolul – toxică pentru măduva osoasă, polipeptidele – nefrotoxice, etc)
2. Efect teratogen
3. Acțiune sensibilizantă (penicilina, etc)
4. Disbacterioză
5. Dereglarea imunogenezei
6. Selecția sușelor rezistente

Bacteriocinele – substanțe proteice bactericide produse de numeroase specii bacteriene și active asupra altor tulpini ale aceeași specii sau asupra speciilor înrudite. Producerea bacteriocinelor este determinată plasmidic (plasmide Col).

Tipuri de bacteriocine: **colicine** (secrete de *Escherichia coli*), **corinecine** (*Corynebacterium*), **vibriocine** (*Vibrio*), **piocine** (*Pseudomonas*), etc.

Studiul sensibilității unei tulpini la bacteriocine (*bacteriocinotipia*) se utilizează în scopuri epidemiologice