

Comparació de la capacitat d'adhesió i invasió d'*Escherichia coli* adherent invasiva (AIEC) en dues línies cel·lulars (I-407 i Caco-2).

Nom estudiant: Júlia Mollà Martínez

Correu electrònic: mollamartinezjulia@gmail.com

Grau en: Biologia

Nom del tutor: Margarita Martínez Medina

Correu electrònic: marga.martinez@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a través de la plataforma de TFG: 04/07/2024

AGRAÏMENTS

A Marga, la meua tutora, per donar-me l'oportunitat d'aprendre i treballar juntament amb ella. Per acompanyar-me i orientar-me de la millor manera, pel seu continu suport emocional i per tots els consells rebuts durant el procés experimental i de redacció d'aquest treball. Moltes gràcies per tot.

Als meus amics i amigues de sempre, per continuar veient-nos créixer durant molts anys més. A les amistats que apareixen durant l'etapa universitària i fan aquest camí molt més fàcil.

A la meua família, que han estat sempre desitjant el millor per a mi. I sobretot als meus pares, per fer-me creure en mi mateixa i estar recolzant-me dia a dia.

A tots i totes els que m'han impulsat per arribar fins ací. Espere que estiguen sempre traient el millor de mi i acompanyant-me durant totes les etapes de la vida.

Gràcies.

ÍNDEX

RESUM	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA	iv
REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT	iv
REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE	iv
INTRODUCCIÓ	1
1. MALALTIA DE CROHN.....	1
2. <i>L'Escherichia coli</i> ADHERENT-INVASIVA	1
3. IDENTIFICACIÓ DEL PATOTIP AIEC AL LABORATORI.....	3
4. MODELS CEL·LULARS: I-407 i CACO-2.....	5
OBJECTIVES	6
METODOLOGIA	7
1. MÈTODES PER A LA REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA	7
2. MÈTODES EXPERIMENTALS	8
2.1. Cultiu de les cèl·lules Caco-2	8
2.2. Preparació de les plaques de cèl·lules per l'assaig d'adhesió i invasió	9
2.3. Cultius bacterians.....	10
2.4. Infecció dels cultius cel·lulars.....	11
2.5. Assaig d'adhesió i d'invasió	11
2.6. Recompte de colònies.....	12
3. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES	12
RESULTATS	13
1. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.....	13
1.1 Resultats de la cerca bibliogràfica i selecció d'articles per l'estudi	13
1.2 Diversitat de mètodes emprats per determinar l'adhesió i invasió de les soques.....	14
1.3 Diferències entre els índexs d'adhesió i invasió usant les Caco-2 i I-407: resultats de la revisió sistemàtica.....	18
2. RESULTATS EXPERIMENTALS	18
2.1. Diferències entre els índexs d'adhesió usant les Caco-2 i les I-407	19
2.2. Diferències entre els índexs d'invasió usant les Caco-2 i les I-407	20

DISCUSSIÓ	21
1. DISCUSSIÓ DE L'APARTAT BIBLIOGRÀFIC	21
1.1 Diversitat de mètodes emprats per a la identificació del patotip AIEC.....	21
1.2 Índexs d'adhesió i invasió de dues soques control en Caco-2 i I-407 publicats en treballs previs	22
2. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS EXPERIMENTALS	23
CONCLUSIÓ	25
BIBLIOGRAFIA	25

RESUM

L'any 2004 el grup de la Dra. Darfeuille-Michaud descriuen un nou patotip d'*E. coli* que anomenen *Escherichia coli* adherent-invasiva (AIEC), ja que les característiques que presentava no es podien relacionar amb cap tret patogènic de les *E. coli* causants d'infeccions gastrointestinals conegudes fins al moment. A més, es va demostrar que es trobava en major prevalença a pacients amb malaltia de Crohn. Molts estudis s'han enfocat a estudiar els mecanismes de patogenicitat del patotip i a trobar un marcador molecular per la seva detecció. Actualment la identificació es basa en la infecció de cultius cel·lulars *in vitro* per determinar la capacitat d'adhesió i invasió de cèl·lules intestinals epitelials i la capacitat de sobreviure i replicar-se en macròfags. Aquest fet implica que la identificació de l'AIEC és complexa, i difícilment estandaritzable. A aquest fet se suma que existeix una gran diversitat de protocols emprats, i afegeix variabilitat als resultats.

Aquest treball està format per dues parts. Una part bibliogràfica en el que es revisen els diferents protocols emprats als estudis que utilitzen els principals models cel·lulars (Caco-2 i I-407). A més, d'aquests estudis, s'analitza la variabilitat dels índexs d'invasió de les soques LF82 i K12 als dos models de cèl·lules per conèixer la variabilitat entre els tipus cel·lulars. També s'ha dut a terme una part experimental, en la que s'ha determinat l'adhesió i invasió de soques AIEC i no-AIEC a les Caco-2 i s'han comparat amb les dades obtingudes al model I-407.

Els resultats han permès observar la gran variabilitat metodològica que existeix en la bibliografia, però principalment es destaquen un mètode per adhesió (MOI: 10 i t d'infecció: 3 h) i un altre per invasió (MOI: 10, t d'infecció: 3h, concentració antibiòtic: 100 µg/mL i t amb antibiòtic: 1 h). Respecte a la comparació dels índexs extrets de la bibliografia, s'ha vist que per les dues soques, LF82 i K12, són més elevats a les Caco-2 que a les I-407. No s'han observat diferències significatives en els índexs d'invasió de les soques AIEC entre els dos tipus cel·lulars, per tant, els dos models classificarien les soques de la mateixa manera. Pel que fa als d'adhesió, s'ha observat que són superiors per les Caco-2 amb major grau de diferenciació (15 dies). Per les soques no-AIEC, els índexs d'invasió obtinguts han sigut molt elevats a les Caco-2, un resultat sorprenent que cal confirmar.

En conclusió, tot i les diferències observades entre els índexs, les dues línies cel·lulars semblarien bons models per a la identificació de l'AIEC, però a les Caco-2, cal adaptar els protocols per obtenir una identificació adequada, sobretot de les soques no-AIEC.

RESUMEN

El año 2004 el grupo de la Dra. Darfeuille-Michaud describen un nuevo patotipo de *E. coli* que denominan *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC), puesto que las características que presentaba no se podían relacionar con ningún rasgo patogénico de las *E. coli* causantes de infecciones gastrointestinales conocidas hasta el momento. Además, se demostró que se encontraba en mayor prevalencia en pacientes con enfermedad de Crohn. Muchos estudios se han enfocado a estudiar los mecanismos de patogenicidad del patotipo y a encontrar un marcador molecular para su detección. Actualmente la identificación se basa en la infección de cultivos celulares *in vitro* para determinar la capacidad de adhesión e invasión de las células intestinales epiteliales y la capacidad de sobrevivir y replicarse en macrófagos. Este hecho implica que la identificación de la AIEC es compleja, y difícilmente estandarizable. A esto se suma la gran diversidad de protocolos empleados, y añade variabilidad a los resultados.

Este trabajo consta de dos partes. Una parte bibliográfica en el que se revisan los diferentes protocolos empleados en los estudios que utilizan los principales modelos celulares (Caco-2 y I-407). Además, de estos estudios, se analiza la variabilidad de los índices de invasión en las cepas LF82 y K12 en los dos modelos de células para conocer la variabilidad entre los tipos celulares. También se ha llevado a cabo una parte experimental en la que se ha determinado la adhesión e invasión de las cepas AIEC y no-AIEC en las Caco-2 y se han comparado con los datos obtenidos en el modelo I-407.

Los resultados han permitido observar la gran variabilidad metodológica que existe en la bibliografía, pero principalmente se destacan un método para adhesión (MOI: 10 y t infección: 3 h) y otro para invasión (MOI: 10, t infección: 3h, concentración del antibiótico: 100 µg/mL y t con antibiótico: 1 h). Respecto a la comparación de los índices extraídos de la bibliografía, para las cepas LF82 y K12, son más elevados en las Caco-2 que en las I-407. No se observaron diferencias significativas en los índices de invasión de las AIEC, por tanto, los dos modelos celulares clasificarían las cepas del mismo modo. En cuanto a los de adhesión, son superiores en las Caco-2 con más diferenciación (15 días). De las cepas no-AIEC, los índices de invasión obtenidos han sido muy elevados en las Caco-2, un resultado sorprendente que hay que confirmar.

En conclusión, a pesar de las diferencias observadas entre los índices, las dos líneas celulares parecerían buenos modelos para la identificación de las AIEC, pero en las Caco-2, hay que adaptar los protocolos para obtener una identificación adecuada sobre todo en las cepas no-AIEC.

ABSTRACT

In 2004, Dr. Darfeuille-Michaud's group described a new pathotype of *E. coli* that they named adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC), given that its characteristics could not be related to any of the pathogenic traits of the *E. coli* causing gastrointestinal infections known so far. Furthermore, it was proved to be more prevalent in patients with Crohn's disease. Many studies have focused on studying the mechanisms of pathogenicity of pathotypes and finding a molecular marker for their detection. Nowadays, identification is based on the infection of cell cultures in vitro to determine the ability to adhere to and invade epithelial intestinal cells and the survival and replication ability in macrophages. This implies that the identification of AIEC is challenging and can hardly be standardised. Moreover, there is a great diversity of protocols used, adding to the variability of the results.

This work consists of two parts. A bibliographical part in which the different protocols used in studies involving the main cell models (Caco-2 and I-407) are reviewed. Additionally, of these studies, the variability of the invasion rates of the LF82 and K12 strains into the two cell models is analyzed in order to determine the variability between the cell types. An experimental part was also carried out, in which the adhesion and invasion of AIEC and non-AIEC strains onto Caco-2 was determined and compared with the data obtained with the I-407 model.

The results allowed us to observe the huge methodological variability that exists in the literature, but we can mainly highlight one method for adhesion (MOI: 10 and t of infection: 3 h) and another for invasion (MOI: 10, t of infection: 3h, antibiotic concentration: 100 µg/ml and t with antibiotic: 1 h). When comparing the indices from the bibliography, it has been observed that for the two strains, LF82 and K12, they are higher in the Caco-2 cells than in the I-407 cells. For the invasion indexes, no significant differences were found in the AIEC strains, so the two cell models would classify the strains the same way. For the adhesion indices, they were found to be higher for the Caco-2 cells with a higher degree of differentiation (15 days). For non-AIEC strains, the invasion rates obtained were very high for Caco-2, a very surprising result that needs to be corroborated. In conclusion, despite the differences observed among the indices, the two cell lines appear to be good models for AIEC identification, but the protocols for Caco-2 need to be adjusted in order to obtain an adequate identification, especially for non-AIEC strains.

REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA

Les investigacions sobre AIEC fan servir mostres de pacients. És molt important que abans de proporcionar-les firmen un consentiment informat (CI), com bé s'esmenta a l'apartat de mètodes. També el comitè ètic ha d'aprovar l'estudi. L'objectiu del CI és garantir que el pacient està informat i d'acord en participar en l'estudi (Ortiz i Burdiles, 2010). Aquest ha de ser la garantia d'una participació lliure i voluntària. El comitè d'ètica avalua i fa el seguiment de l'estudi. El seu objectiu és protegir la dignitat i drets dels pacients afavorint el compliment de la legislació (Párraga i Martín, 2019). Així s'evita l'incompliment de les normes i s'assegura la confidencialitat de les dades que els pacients proporcionen. En conclusió, com dur a terme una bona investigació científica.

REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT

Al treball es realitzen cultius bacterians amb diferents soques d'*E. coli* categoritzades amb nivell de bioseguretat 2 (BSL2) (Environment, Health and Safety, s.d.). L'assignació d'aquest nivell té en consideració el microorganisme emprat, les instal·lacions i l'equip i procediments necessaris per dur a terme un treball amb total seguretat (OMS, 2005). En aquest laboratori els cultius s'han manipulat a una cabina de seguretat microbiològica (classe II) per evitar contaminar-los i assegurar la protecció de l'usuari. Finalment, per gestionar aquests residus és molt important disposar de contenidors específics on llençar tot el que ha estat en contacte amb els bacteris, així com disposar d'equips de protecció personal i una autoclau per eliminar correctament qualsevol contaminació de l'equipament per poder-lo reutilitzar, seguint sempre els protocols establerts a la Universitat.

REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE

El patotip AIEC està associat a la mucosa ileal de pacients amb malaltia de Crohn (Darfeuille-Michaud et al., 2004). Un retard en la diagnosi està correlacionat amb un major risc de patir complicacions i cirurgies intestinals (Schoepfer et al. 2013). El percentatge d'error en el diagnòstic és superior en dones que homes (Schoepfer et al. 2013), això manifesta un biaix de gènere. Els símptomes sovint es confonen amb afeccions ginecològiques o altres trastorns gastrointestinals funcionals (Sempere et al., 2023). Sabent que existeixen diferències en els símptomes entre homes i dones, caldria estudiar bé com es presenten més comunament a cada gènere per aconseguir un diagnòstic a temps i evitar accentuar les complicacions que causa el Crohn per tractar adequadament sense importar el gènere i evitar així una percepció distorsionada.

INTRODUCCIÓ

1. MALALTIA DE CROHN

La malaltia de Crohn és una malaltia inflamatòria intestinal crònica d'etiologia desconeguda associada a una resposta immunitària alterada (Ballester et al., 2017). Actualment, es considera que és el resultat de la interacció entre de la susceptibilitat genètica, els factors ambientals i la microbiota intestinal, que provoquen una resposta immune anormal de la mucosa intestinal (Torres et al., 2016). La malaltia de Crohn causa períodes d'activitat i remissió que poden condicionar greument la qualitat de vida dels pacients, i la seva incidència i prevalença ha augmentat significativament en tot el món (Ballester et al., 2017). Aquesta es classifica segons la classificació de Montreal (**Taula 1**).

Taula 1. Classificació de Montreal segons: l'edat de la diagnosi (A), la localització de la malaltia (L) i el comportament de la malaltia (B) (Torres et al., 2016).

A	Edat de diagnosi	A1: <16 anys; A2: 17-40 anys; A3: >40 anys
L	Localització	L1: ili; L2: còlon; L3: ileocolònica i L4*: malaltia gastrointestinal superior
B	Comportament	B1: no estenosat ni fistulitzant; B2: estenosat; B3: fistulitzant; P**

*L4: modificador que s'afegeix a la classificació de L1-L3 quan també hi ha present malaltia gastrointestinal superior.

**P: modificador que s'afegeix a la classificació de B1-B3 si hi ha malaltia perianal present al mateix temps.

La disbiosi intestinal en pacients amb malaltia de Crohn es presenta amb una disminució dels grups de Bacteroides i Firmicutes (com *Faecalibacterium prausnitzii*, bacteri comensal amb propietats antiinflamatòries) i un major nombre de bacteris associats a la mucosa com la *E. coli* adherent-invasiva (Ballester et al., 2017).

2. L'*Escherichia coli* ADHERENT-INVASIVA

L'any 1998, Darfeuille-Michaud et al. publica un treball en què s'estudien les poblacions d'*Escherichia coli* de la mucosa intestinal de pacients amb malaltia de Crohn i s'identifiquen soques adherents amb més freqüència en aquests pacients que en individus sans. Un any més tard, el mateix grup demostra que moltes de les soques adherents aïllades de la mucosa ileal de pacients amb malaltia de Crohn no només són adherents, sinó que també són invasives (Bodeau et al., 1999).

L'any 2004, Darfeuille-Michaud et al. publiquen un estudi en el qual es proposa un nou patotip d'*Escherichia coli* que anomenen *Escherichia coli* adherent-invasiva (AIEC). En aquest estudi, s'analitza la composició bacteriana de pacients amb malaltia de Crohn en comparació amb el grup d'asimptomàtics (grup control) i es demostra que hi ha una prevalença anormal d'*E. coli* a la mucosa intestinal (Darfeuille-Michaud et al., 2004). En aquest estudi es van incloure tres grups de pacients: amb malaltia de Crohn ileal i colònica i amb colitis ulcerosa, i dos grups control. Pel que fa als resultats de prevalença que es van obtenir, era superior als grups amb malaltia de Crohn i colitis ulcerosa que als grups controls. (Darfeuille-Michaud et al., 2004). A la revisió realitzada per Nadalian et al. (2020) analitzen els resultats de prevalença d'AIEC en malalts de Crohn i colitis ulcerosa de diferents estudis. S'observa que la prevalença de l'AIEC entre els pacients amb malaltia de Crohn és del 29% (0,17-0,45), mentre que pels sans és del 9% (0,03-0,19). I pel que fa a la

colitis ulcerosa, també veuen que la prevalença d'AIEC és major en aquest grup de pacients (12%, 0,01-0,34) que al grup dels sans (5%, 0,0-0,17) (Nadalian et al., 2020).

Aquestes soques amb capacitat d'adherència i invasió, i amb capacitat de sobreviure i replicar-se en macròfags, no es podien relacionar amb cap dels patotips de les *E. coli* causants d'infeccions gastrointestinals que es coneixien fins al moment, ja que no presentaven cap dels factors de virulència característics d'aquests. Es va comprovar que no presentava el gen plasmídic *ipaC* que codifica per la invasió de l'*E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Tampoc el gen *eae*, que codifica la intimina de l'*E. coli* enteropatogènica (EPEC). Ni el gen *afaD* implicat en la invasió d'*E. coli* adherent difusa (DAEC), ni el gen *tia* que codifica una proteïna de membrana externa involucrada en la invasivitat d'*E. coli* enterotoxigènica (ETEC) (Darfeuille-Michaud et al., 2004). I és per això, que es va definir com un nou patotip.

Per tal de considerar una soca AIEC, segons la definició publicada el 2004 per Darfeuille-Michaud i col·laboradors, aquesta ha de tenir la capacitat d'envair les cèl·lules epitelials Intestine-407 i HEp-2 amb un índex d'invasió igual o superior al 0,1% de l'inòcul original. Així com, la capacitat d'adherir-se a les cèl·lules intestinals diferenciades Caco-2 i/o indiferenciades Intestine-407 amb un índex igual o superior a un bacteri per cèl·lula. També, ha d'involucrar la polimerització d'actina de la cèl·lula hoste i reclutar els microtúbuls en el procés d'invasió. No ha de presentar cap determinant invasiu conegut prèviament, i a més, ha de ser capaç de sobreviure i replicar-se dins els macròfags J774-A1 (Darfeuille-Michaud et al., 2004).

Posteriorment a la definició, s'han estudiat els mecanismes de patogenicitat (**Figura 1**) per conèixer millor el patotip. Aquestes característiques s'han estudiat principalment a la soca de referència LF82 (Mansour et al., 2023) i a altres com la NRG857 i la O83:H1 (Pamela et al., 2018).

L'habilitat de l'AIEC per adherir-se i envair les cèl·lules epitelials està mediada per diferents factors de virulència, entre els quals s'inclou FimH, l'adhesina del pili tipus I que s'uneix al receptor CEACAM6 (Cell Adhesion Molecules 6) (Mansour et al., 2023). L'estudi d'immunohistoquímica realitzat per Barnich et al. (2007) va demostrar un augment significatiu de l'expressió d'aquest receptor en la mucosa ileal no afectada o inflamada de pacients amb malaltia de Crohn en comparació amb la mucosa dels controls sense cap malaltia intestinal inflamatòria. Se suggereix que aquest receptor és un factor determinant per a les soques AIEC en la colonització de la mucosa ileal de pacients amb malaltia de Crohn (Barnich et al., 2007). Tot i que no està clar si la sobreexpressió del receptor és deguda a la presència d'AIEC, o la colonització d'AIEC és conseqüència de la sobreexpressió del receptor (Barnich et al., 2007). A més de *fimH*, s'ha comprovat que els gens *ompC* i *chiA*, són rellevants per adherir-se a les cèl·lules epitelials intestinals (Mansour et al., 2023). Algunes soques tenen invasines com IbeA, que es troba a la membrana externa i interactua amb els receptors de l'hoste. Aquesta invasió és crucial per envair les cèl·lules i colonitzar l'intestí (Mansour et al., 2023).

Els flagels, també participen facilitant l'adhesió i invasió. Es va veure que les soques AIEC eren hiperflagelades respecte a les *E. coli* comensals, això resulta amb una major capacitat per penetrar les criptes intestinals (Mansour et al., 2023). Però a més, per poder travessar la capa de moc que recobreix aquestes cèl·lules, secreten enzims mucolítics, com *Vat*, per afavorir més la invasió de la mucosa (Mansour et al., 2023).

També, el patotip es caracteritza per poder-se replicar dins els macròfags, com els patògens *Shigella* i *Salmonella*, però en l'AIEC el sistema de secreció del tipus III és absent. Per això, es proposa que aquestes soques fan servir mecanismes únics per envair i replicar-se dins de les cèl·lules hostes (Mansour et al., 2023). A més, contenen altres propietats relacionades amb la supervivència i replicació en macròfags, com proteïnes que se secreten durant situacions d'estrès com l'HtrA, la tiol-disulfur oxireductasa (DsbA) i la proteïna d'unió a l'RNA (Hfq) (Pamela et al., 2018).

Un altre tret patogènic que van descobrir Martínez-Medina et al. (2009) característic d'aquest patotip és la formació de biofilms. Es va veure que les soques AIEC tenien major capacitat per formar biofilms que les soques d'*E. coli* aïllades de la mucosa intestinal (no-AIEC). Tot i que encara no s'ha demostrat la formació d'aquests biofilms *in vivo*.

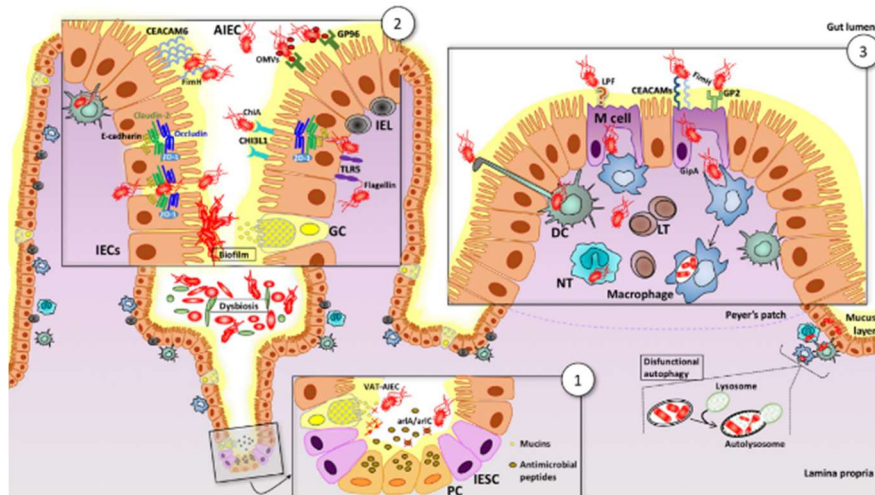


Figura 1. Interacció de l'AIEC amb la mucosa intestinal en context de malaltia intestinal inflamatòria. (1) AIEC creuant la capa mucosa resisteix als pèptids antimicrobians; (2) AIEC s'adhereix a les cèl·lules epitelials intestinals (IEC) i colonitza la mucosa intestinal; (3) AIEC penetra la làmina pròpia i les plaques de Peyer a través de les cèl·lules M i interactua amb les cèl·lules del sistema immunitari (Pamela et al., 2018).

3. IDENTIFICACIÓ DEL PATOTIP AIEC AL LABORATORI

Actualment, per tal d'identificar una soca AIEC d'una mostra clínica, primerament, cal aïllar i confirmar que es tracta d'una *E. coli*. Un cop confirmat, s'han de realitzar assajos d'adhesió i invasió en cèl·lules intestinals epitelials, i també, assajos de supervivència i replicació en macròfags per veure si es compleixen les característiques que defineixen el patotip. Aquesta identificació es basa en caràcters fenotípics a partir d'assajos d'infecció dels cultius cel·lulars els quals requereixen molt temps i són difícils d'estandarditzar (Camprubí-Font et al., 2019) i, per tant, molt complexos d'implementar en estudis clínics.

Per això, des de la definició del patotip, s'han realitzat diferents estudis centrats en la recerca dels mecanismes genètics que caracteritzen l'AIEC. El descobriment d'un marcador molecular per a la identificació de l'AIEC facilitaria significativament els estudis epidemiològics per determinar-ne millor la prevalença i abundància i descobrir les vies de transmissió, a més de facilitar els estudis clínics en pacients amb malaltia de Crohn (Camprubí-Font et al., 2019). Així, no caldria realitzar assajos amb cultius cel·lulars, sinó que es faria directament a partir de la mostra presa del pacient i, per tant, la identificació resultaria més ràpida i fàcilment estandarditzable.

Els primers estudis genètics es van centrar en la detecció dels gens de virulència coneguts presents a altres patotips d'*E. coli* mitjançant PCR (Camprubí-Font et al., 2019; Céspedes et al., 2017; Chassaing et al., 2011; Conte et al., 2014; Darfeuille-Michaud et al., 2004; Martínez-Medina et al., 2009; Vazeille et al., 2016). També, s'han realitzat estudis genòmics per trobat nous gens i mutacions puntuals (Baumgart et al., 2007; Camprubí-Font et al., 2019; Dogan et al., 2014; O'Brien et al., 2016; Zhang et al., 2015). A més d'estudis de comparació de seqüències dels gens de virulència (Camprubí-Font et al., 2019) i també de transcriptòmica comparativa per identificar els gens que s'expressen diferencialment en el procés d'infecció (Bonet-Rossinyol et al., 2023). En cap dels estudis s'han evidenciat gens específics, o variants d'aquests, àmpliament distribuïts en les soques AIEC. Però, el que es va observar és que hi havia gens més prevalents o diferencialment més expressats a les soques AIEC que les no AIEC (Bonet-Rossinyol et al., 2023; Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020). Fins ara, sols vuit elements genètics s'han proposat com possibles marcadors moleculars, tot i que, molts d'ells presenten una baixa sensibilitat o s'han estudiat en un nombre reduït de soques (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020). Entre els suggerits, es troben els gens *pduC*, *lpfA*, *lpfA+gipA*, *chuA*, *pic+ampR*, i també 29 polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) i 3 regions genòmiques.

Per tant, donat que la identificació del patotip de moment només es pot fer mitjançant l'aïllament i caracterització de les soques infectant cultius cel·lulars *in vitro*, és molt important que existeixin protocols estandarditzats per tal de tenir certesa que una soca és considerada AIEC o no-AIEC en qualsevol laboratori d'arreu del món. Actualment, els mètodes, les línies cel·lulars i l'origen de les soques que s'utilitzen són variables entre grups, la qual cosa pot induir variabilitat a l'anàlisi, el qual de per si ja és molt variable, i conduir a obtenir uns índexs d'adherència i/o invasió variables entre estudis (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020). Això es pot evidenciar comparant els índexs obtinguts per la soca LF82 que sol ser usada en molts treballs com a soca controls. Aquesta presenta una variabilitat d'entre 4,8-62,8 bact/cèl en els índexs d'adhesió i entre 0,12% a 12,2% en els índexs d'invasió (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020).

Aquest fet és molt rellevant en la recerca sobre l'AIEC, inclosa la cerca i validació de marcadors moleculars per a la identificació del patotip. Per tal d'estudiar els mecanismes de patogenicitat de l'AIEC és important que la soca d'estudi estigui ben identificada com a tal, i també, és molt important que el socaris que s'utilitzin per a la validació de marcadors ho siguin. Per tant, el fet que no existeixen estudis d'intercalibració en els que s'hagi

confirmat que les soques AIEC identificades en un laboratori també ho siguin en un altre és un problema. No seria molt crucial en el cas de soques amb fenotips molt clars, ja que s'espera que el fenotip es mantingui independentment del protocol usat, però sí en el cas de soques que tenen fenotips febles, perquè el fet que tinguin valors d'índexs d'adherència i invasió a cèl·lules intestinals epitelials o de supervivència i replicació en macròfags mitjans-baixos podrien implicar una classificació variable segons el protocol usat.

4. MODELS CEL·LULARS: I-407 i CACO-2

Tal com s'observa a la revisió realitzada per Camprubí-Font i Martínez-Medina (2020), hi ha una gran varietat de models cel·lulars que es fan servir per als estudis d'adhesió i invasió, i de replicació en macròfags per a la identificació de l'AIEC. Però, les més utilitzades pels estudis d'adhesió i invasió són principalment les I-407 (22%) i les Caco-2 (36%) (**Figura 2**), és per això que aquest treball se centra principalment en aquestes dues.

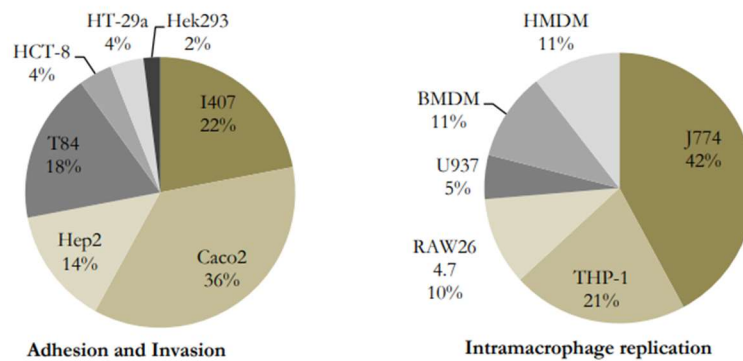


Figura 2. Gràfic de revisió de les cèl·lules emprades per la identificació d'AIEC. Anàlisi de les línies cel·lulars utilitzades per l'adhesió i invasió i replicació en macròfags (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020).

Intestine-407 (I-407) és una de les línies cel·lulars que es va usar per determinar la capacitat invasiva d'una soca en la definició del patotip AIEC (Darfeuille-Michaud et al. 2004). Són cèl·lules adherents amb morfologia epitelial. A més, expressen el receptor CEACAM6 (Harmonizome, s.d.). L'origen d'aquesta línia cel·lular deriva inicialment de teixit intestinal embrionari normal, no tumoral, fins que més tard, es va descobrir que s'havia establert a través de la contaminació amb la línia cel·lular HeLa.

Aquesta línia cel·lular HeLa, es va aïllar d'una pacient amb adenocarcinoma de cèrvix. S'ha demostrat que aquestes cèl·lules contenen DNA del papil·loma humà (HPV) (Lucey et al., 2009). Com que era una línia cel·lular molt robusta i immortal, es va distribuir per diferents laboratoris del món per estudiar la primera línia cel·lular de càncer humà que s'havia establert fins al moment (Lucey et al., 2009). Una de les seves característiques és la seva taxa de proliferació anormalment ràpida, que s'adapta molt fàcilment a diferents condicions de creixement i medis de cultiu, i fa que sigui molt fàcil cultivar-les, per això, aquestes cèl·lules són una de les fonts més importants de contaminació cel·lular creuada (Lin et al., 2019).

La línia cel·lular Caco-2 és la que s'utilitza en aquest treball, i també és una de les més utilitzades actualment als estudis d'identificació de l'AIEC. Aquest llinatge deriva originalment d'un adenocarcinoma de colon d'humà (Cancer Coli), que dona nom a aquest model. En aquest treball es fan servir les de la casa comercial ATCC (Caco-2 ATCC HTB-37), i s'estima que el temps de duplicació d'aquestes és d'aproximadament 62 hores (ATCC, s.d.).

Quan el cultiu és confluent, comencen a diferenciar-se espontàniament amb una morfologia de tipus epitelial. Tarden entre 14 i 21 dies fins a estar completament diferenciades, formant una monocapa cel·lular amb les característiques morfològiques i funcionals dels enteròcits de l'intestí prim. Després dels 21 dies, es veuen completament polaritzades (**Figura 3**), presentant a la part apical microvellositats i formant unions estretes amb les cèl·lules adjacents. D'entre les línies cel·lulars epitelials utilitzades a l'estudi de Barnich et al. (2007) per detectar l'expressió del receptor CEACAM6, es va demostrar que la línia cel·lular Caco-2, sí que presentava expressió.

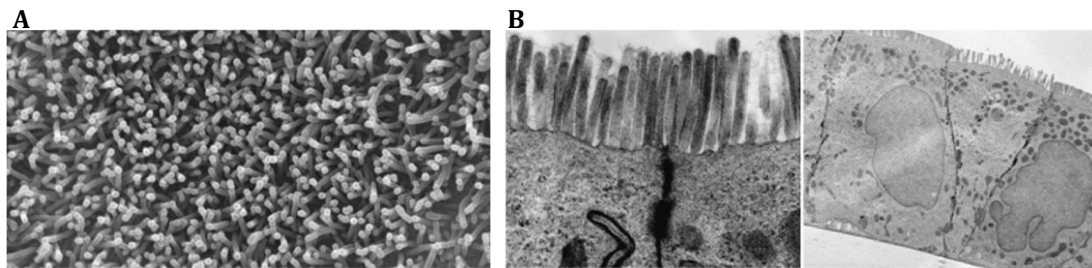


Figura 3. Imatge de les cèl·lules Caco-2 **A:** polaritzades després de 21 dies en cultiu amb microscopi electrònic de rastreig (Lea, 2015). **B:** diferenciació després de 21 dies de confluència en microscopi electrònic amb les estructures de les cèl·lules epitelials intestinals formades (Sinnecker et al., 2014).

OBJECTIVES

The current method for AIEC (Adherent-Invasive *Escherichia coli*) identification involves infecting cell cultures to assess their adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells, as well as their survival and replication within macrophages. However, the techniques used for AIEC identification differ among research groups, and there is a lack of inter-laboratory validation. Therefore, establishing a standardized, consensus-based approach is essential.

The specific objectives are:

1. To conduct a comprehensive literature review of all the methods used to classify AIEC since the pathotype was described, focusing on those that used Caco-2 and I-407 cell lines.
2. To conduct a systematic review to study the variability of the adhesion and invasion levels obtained across different methods, using the LF82 strain as a reference.
3. To determine the adhesion and invasion levels of the Girona strain collection in Caco-2 cells.
4. To compare the adhesion and invasion levels of the Girona strain collection obtained in Caco-2 and I-407 cells.

METODOLOGIA

1. MÈTODES PER A LA REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

Per tal de donar resposta als dos primers objectius del treball s'ha dut a terme una revisió bibliogràfica utilitzant la base de dades del PubMed. Aquesta cerca era relativament àmplia, ja que en aquesta temàtica no hi ha una quantitat de bibliografia massa gran i ens interessava incloure tots els articles publicats. Mitjançant la cerca avançada es va buscar el terme 'AIEC' en tot el text del document, perquè en tots els articles aquestes sigles s'utilitzen per anomenar el patotip d'estudi. Donat que ja s'havia fet una revisió prèvia al grup de recerca en el marc de la tesi de la Dra. Carla Camprubí (2019), es va fer una cerca filtrada per data, de manera que es van cercar els articles publicats del 2019 al 25 d'abril de 2024. Per al present estudi es van tenir en compte la selecció d'articles de la Dra. Carla Camprubí (2019) juntament amb els seleccionats en aquest estudi.

Per al primer objectiu es pretenia fer una descripció de la variabilitat dels mètodes que s'han utilitzat en els diferents grups de recerca per a identificar una soca com a AIEC, ja que des de la seva definició l'any 2004 els mètodes emprats són diversos. En aquest treball ens hem focalitzat en aquells estudis que han utilitzat les línies Caco-2 i I-407, el fet que són les dues línies més àmpliament utilitzades.

Els **critèris d'inclusió** dels articles van ser:

- Articles amb un protocol d'adhesió i invasió definit.
- Articles que usaren el model de cultiu cel·lular Caco-2 i/o I-407.
- Articles amb resultats dels índexs d'adhesió o invasió per les soques K12 i/o LF82 o altres de referència en els models cel·lulars Caco-2 i/o I-407.

Els **critèris d'exclusió** dels articles van ser:

- Articles que no feien servir el model cel·lular Caco-2 i/o I-407.
- Articles on no hi havia els resultats dels índexs d'adhesió i/o invasió en Caco-2 i/o I-407.
- Articles on l'experiment que es realitzava no eren l'assaig d'adhesió ni d'invasió.

Dels articles seleccionats es va extreure la següent informació:

- Tipus cel·lular utilitzat als assajos d'adhesió i invasió.
- MOI (*Multiplicity Of Infection*, que es defineix com el nombre de bacteris que s'usen per a infectar cada cèl·lula eucariota).
- Temps d'infecció.
- Antibiòtic usat post-infecció per eliminar els bacteris no internalitzats, concentració i temps d'incubació.
- País on es troba el grup de recerca principal que signa la publicació.

Aquesta informació serveix per conèixer com es du a terme l'assaig d'adhesió i invasió a cada article. Resumidament, primer s'incuben les cèl·lules (a una concentració coneguda) a la placa on es duu a terme l'assaig formant una monocapa. El temps d'incubació d'aquestes cèl·lules dependrà del tipus cel·lular i de l'assaig que es porti a terme (adhesió o invasió).

Posteriorment, aquestes cèl·lules s'infecten a una MOI coneguda i s'incuben durant un determinat temps. Passat aquest temps, per l'assaig d'adhesió es fa el recompte dels bacteris que han quedat adherits extracel·lularment. Per al d'invasió, després del temps d'incubació, s'afegeix antibiòtic i s'incuba de nou per matar els bacteris extracel·lulars, i finalment, es fa el recompte dels bacteris que han internalitzat les cèl·lules.

El segon objectiu vol respondre una pregunta: Hi ha diferències entre mètodes pel que fa als índexs d'adhesió i invasió obtinguts per a una mateixa soca? Per respondre aquesta pregunta es va prendre nota dels valors dels índexs d'adhesió i invasió de la soca AIEC de referència LF82 i de la soca control K12, essent ambdues les més utilitzades en els estudis publicats. En alguns casos, aquesta dada no estava disponible directament a l'article i es va decidir demanar-la als autors o calcular-la si es proporcionava la informació de les cèl·lules inicials a partir de la MOI. Per això, per poder obtenir informació més detallada, sobretot dels resultats dels índexs, es va contactar amb els següents *corresponding authors*: Sra. Bukato (Rússia), Sr. Katouli (Austràlia), Sr. Wall (Regne Unit), Sra. Gülşen (Turquia), Sr. Fazeli (Iran) i Sra. Superti (Itàlia). Sols es va obtenir resposta del Sr. Wall i la Sra. Bukato, però no van poder proporcionar la informació que se'ls demanava, ja que no la disposaven.

2. MÈTODES EXPERIMENTALS

2.1. Cultiu de les cèl·lules Caco-2

Per fer créixer i mantenir les cèl·lules Caco-2 (ATCC HTB-37) es va utilitzar el medi de cultiu EMEM (Gibco, USA) el qual es complementava amb 1X de: vitamines (Gibco, USA), L-glutamina (Gibco, USA), antibiòtics, aminoàcids (HyClone, USA); i sèrum fetal boví (FBS) al 10% (HyClone, USA). El medi es mantenia a la nevera i es temperava a temperatura ambient abans del seu ús. Per realitzar els passes de cèl·lules, en primer lloc, s'observaven les cèl·lules al microscopi (CKX41, OLYMPUS) per comprovar si estaven ben crescudes. S'esperava aproximadament entre el 80 i 90% de confluència abans de dur a terme el passe (**Figura 4**). Tot el procediment es va dur a terme a la cabina de seguretat (Heraeus, Alemanya) per tal d'assegurar l'esterilitat de l'ambient i protegir a l'usuari.

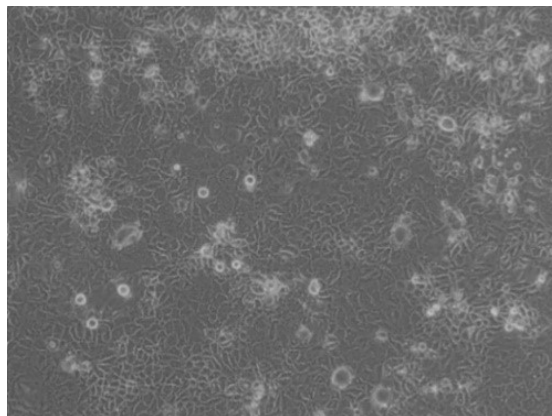


Figura 4. Cèl·lules Caco-2 observades al microscopi (CKX41, OLYMPUS) al 80-90% de confluència abans de realitzar el passe. Font pròpia.

Primerament, es va aspirar el medi que contenia el flascó i es van afegir 10 mL de PBS (Corning, USA), que es repartien per tota la superfície de les cèl·lules, per rentar-les bé del medi, i després s'aspirava. Tot seguit, es va afegir 1 mL de tripsina (Corning, USA) i es va deixar a l'estufa a 37 °C amb 5% CO₂. Passats 5 minuts, es donaven uns cops secs per desenganxar les cèl·lules del flascó completament. Cal tenir en compte que les cèl·lules no poden estar molt de temps en contacte amb la tripsina perquè, aquesta pot afectar la seva viabilitat i que no siguin òptimes per l'experiment. Després, en van addicionar 10 mL de medi EMEM complet, per aturar l'efecte de la tripsina, i aquest volum amb les cèl·lules es va passar a un Falcon.

Aquest Falcon es va centrifugar (Centrifuge 5804R, Eppendorf) durant 5 minuts a 4 °C i 1500 r.p.m. Es va aspirar el sobrenedant i es va disgregar bé el pellet, després es va resuspendre amb 10 mL d'EMEM complet. És molt important pipetejar molts cops per tal d'homogeneïtzar i disgregar bé les cèl·lules i que així, puguin créixer correctament a un nou flascó. Aquest nou flascó es preparava, segons si les cèl·lules es mantenien 3 o 4 dies incubant, 1:3 o 1:4 respectivament, a un volum final de 20 mL i un flascó T75 (3 mL cèl·lules + 17 mL d'EMEM o 2 mL cèl·lules + 18 mL d'EMEM). Això sempre que les cèl·lules s'hagin resuspès en 10 mL de medi i la confluència fos d'entre el 80-90%. Finalment, es deixaven incubar a 37 °C amb 5% CO₂ aproximadament uns 3 o 4 dies perquè continuessin creixent, fins que s'arribava a una confluència al voltant del 80-90% (**Figura 4**).

2.2. Preparació de les plaques de cèl·lules per l'assaig d'adhesió i invasió

Per als assajos d'adhesió i invasió, cal preparar les plaques amb la concentració de cèl·lules desitjada. Per a això, un cop es tenen les cèl·lules en suspensió i disgregades, se n'ha de fer un recompte.

Per fer-ho, es posaven 10 µL a un eppendorf per fer una dilució 1/5 amb colorant *Trypan blue* (10 µL de cèl·lules + 40 µL de colorant). D'aquesta suspensió, s'agafaven 10 µL i es col·locaven a la cambra de Neubauer per fer el recompte. De la cambra, es comptaven tres dels nou quadrats que té, normalment una de les diagonals. Amb aquest recompte s'obtenien el nombre de cèl·lules que hi havia per mL (cèl/mL) (**Equació 1**).

$$R = \frac{R1 + R2 + R3}{3} \times 5 \times 9 \times 1000$$

Equació 1. Càlcul per obtenir les cèl·lules que hi ha per mL (cèl/mL). Mitjana del recompte de cèl·lules dels tres quadrats comptats de la cambra (R1+R2+R3/3), multiplicat pel factor de dilució amb el colorant *Trypan blue* (x5), pels quadrats totals que hi ha a la cambra (x9) i finalment x1000 per passar de µl a mL.

Per als assajos s'utilitzaven plaques de 24 pouets on cada un havia de tenir un total d'1 mL a una concentració de 1,5x10⁵ cèl·lules per pouet. Per determinar el volum de cèl·lules que s'havien d'afegir (cèl/pouet) i que estigués a la concentració desitjada, es realitzava el següent càlcul (**Equació 2**).

$$C_{inicial} \times V_{inicial} = C_{final} \times V_{final}$$

Equació 2. Càlcul per obtenir el volum de cèl·lules per cada pouet (cèl/pouet). On la $C_{inicial}$ són les cèl·lules/mL (**Equació 1**). La C_{final} és la concentració de cèl·lules que es volen per pouet ($1,5 \times 10^5$ cèl/pouet). El V_{final} és 1 mL multiplicat pel nombre de pouets que s'utilitzaran a l'assaig, i el $V_{inicial}$ el que s'ha de calcular.

Les plaques per l'assaig d'invasió es deixaven incubant durant 48 hores a 37 °C amb 5% CO₂. En canvi, per l'assaig d'adhesió es van deixar, a les mateixes condicions, durant 7 i 15 dies per tal de tenir les cèl·lules amb un cert nivell de diferenciació. Com que als articles no estava molt ben especificat, es va consultar per correu el protocol que feien servir la Dra. Dogan i els seus col·laboradors i per l'adhesió a 7 dies es va seguir aquest. Pels 15 dies es va seguir el protocol de Darfeuille-Michaud et al. (2004).

2.3. Cultius bacterians

El dia abans de realitzar l'assaig, es preparaven els cultius bacterians de les diferents soques d'*E. coli* amb les que posteriorment s'infectaven les cèl·lules Caco-2. Al treball es van incloure 10 soques AIEC i 10 no-AIEC (ECG) (Martinez-Medina et al. 2009), les quals presenten una distribució filogenètica semblant entre elles (**Taula 2**).

Taula 2. Soques d'estudi, aïllades i caracteritzades prèviament al laboratori (Martinez-Medina et al. 2009). S'inclouen 10 soques AIEC i 10 no-AIEC. S'indica l'origen (CD: malaltia de Crohn i non-IBD: no malaltia inflamatòria) i el filogrup al qual pertanyen. La soca LF82 i la *E. coli* no patògena K12 s'inclouen com a soques de referència.

	Soca	Pacient	Filogrup
AIEC	AIEC 04	non-IBD	B2
	AIEC 07	non-IBD	B1
	AIEC 11	CD	B2
	AIEC 12	CD	B2
	AIEC 14-1	CD	B2
	AIEC 15-1	CD	B2
	AIEC 16-1	CD	B2
	AIEC 17	CD	D
	AIEC 23	CD	A
	AIEC 25	CD	B2
	LF82	CD	B2
no-AIEC	ECG001	CD	B2
	ECG004	non-IBD	B1
	ECG008	non-IBD	B2
	ECG009	CD	B2
	ECG015	CD	B2
	ECG018	CD	A1
	ECG026	CD	B2
	ECG034	CD	D
	ECG042	CD	B2
	ECG043	non-IBD	B2
	K12	non-IBD	A

Per realitzar els cultius, s'inoculaven a partir de cultius glicerinars a 1 mL de Luria-Bertani líquid (LB) en un tub de vidre amb tap transpirable i es deixaven durant tota la nit a l'estufa a 37 °C.

2.4. Infecció dels cultius cel·lulars

El protocol d'infecció es va dur a terme amb una MOI de 20. La MOI és la multiplicitat d'infecció, és a dir, el nombre de bacteris que infectaran una cèl·lula (bact/cèl). Tenint en compte que els assajos es fan en plaques de 24 pous amb $1,5 \times 10^5$ cèl·lules per pouet, es preparaven suspensions bacterianes que continguessin 3×10^6 bacteris per cada 25 μL , que era el volum d'infecció, per tal de tenir la MOI desitjada.

Primer, amb els cultius incubats durant tota la nit, es preparava una dilució 1/2 amb LB (500 μL cultiu i 500 μL d'LB), i es mesurava l'absorbància a una densitat òptica (DO) de 620. Es mesurava amb el cultiu diluït per tenir valors més fiables d'absorbància. Aquest valor es multiplicava després per 2, per desfer la dilució. Per conèixer el volum de bacteris que calia afegir a cada pouet per infectar les cèl·lules a una MOI de 20, es preparava una solució a una DO de 0,075 (**Equació 3**). Una DO de 0,1 representa $1,6 \times 10^8$ bact/mL. Una DO de 0,075 representa una concentració de $1,2 \times 10^8$ bact/mL, que en els 25 μL que s'afegien per a infectar serien els 3×10^6 bacteris necessaris per infectar a una MOI de 20 al pouet de cèl·lules amb 1 mL de medi. Com que cada pouet havia de contenir un volum total d'1 mL, el volum restant al dels bacteris era d'EMEM + 10% d'FBS.

$$V \text{ bacteris } (\mu\text{L}) = \frac{0,075}{DO_{620}}$$

Equació 3. Càlcul del volum de bacteris (μL) que s'afegeixen a cada pouet (solució a una DO= 0,075).

2.5. Assaig d'adhesió i d'invasió

Un cop les plaques han estat 2 dies incubant per l'assaig d'invasió, i 7 i 15 dies pel d'adhesió, es procedia amb l'assaig.

Primer, es rentaven les cèl·lules dues vegades amb 1 mL de PBS (Corning, USA), i després, s'afegia 1 mL del medi EMEM a cada pouet de la placa. Aquest medi ja no contenia cap antibiòtic, sols estava complementat amb FBS desactivat (10%). Les cèl·lules posteriorment s'infectaven amb 25 μL de la dilució preparada amb el cultiu de nit dels bacteris (apartat 2.4) que contenia la concentració de bacteris (3×10^6) per tenir una MOI de 20. Un cop infectades les cèl·lules, s'incubaven les plaques durant 3 hores a 37 °C amb 5% CO_2 .

Per l'assaig d'adhesió, passat el temps d'incubació es feien tres rentats amb PBS (Corning, USA) i s'afegien 500 μL de tritó 1X (Sigma, USA) a cada pouet. Al cap de cinc minuts es rascava el fons per poder aixecar bé les cèl·lules. Cal tenir en compte que el tritó no pot estar més de 30 minuts en contacte amb les cèl·lules perquè podria afectar la viabilitat dels bacteris. Es pipetejava diversos cops i es feien dilucions seriades (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4}) amb Ringer (450 μL Ringer + 50 μL mostra). Després, se sembraven les dilucions 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} en LB agar.

Per l'assaig d'invasió, es va fer un rentat amb PBS (Corning, USA), i es va afegir 1 mL del medi amb 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina i es va tornar a incubar durant una hora més a 37 °C amb 5% CO_2 per tal d'eliminar els bacteris extracel·lulars i quedar-nos només amb els que havien envaït les cèl·lules i s'havien replicat intercel·lularment. Passada aquesta hora, es

van fer 2 rentats amb 1 mL de PBS (Corning, USA), i es van afegir 500 µL de tritó (1%) a cada pouet. Després, es rascava el fons per desenganxar bé totes les cèl·lules. I finalment, es va fer un banc de dilucions (10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3}) amb Ringer (450 µL Ringer + 50 µL mostra), i es van sembrar la mostra directa i les dilucions 10^{-1} i 10^{-2} en LB agar.

A les plaques se sembraven 25 µL de les dilucions corresponents, suaument amb la punta de la micropipeta s'expandia tot el volum per tot el quadrat de la placa. Finalment, les plaques s'incubaven durant tota la nit a 37 °C.

2.6. Recompte de colònies

L'endemà de l'assaig, es feia el recompte de colònies de les plaques. Tenint en compte que es donaven com vàlides aquelles plaques que tingueren entre 15 i 150 colònies i comprovant que cap placa estava contaminada, és a dir, que sols s'observava un únic tipus de colònia per cada dilució plaquejada. Un cop obtingut el nombre de colònies de cada dilució plaquejada, es calculava el nombre de colònies de cada pouet (ufc/pouet) (**Equació 4**).

$$ufc/pouet = \frac{\sum \text{colònies}}{V \times d} \times 0,5$$

Equació 4. Càlcul del nombre de colònies per cada pouet de la placa (ufc/pouet). Divisió del nombre de colònies comptades, entre el volum que s'ha afegit al pouet ($V= 1000 \mu\text{L}$) i la dilució plaquejada (d), tot multiplicat pel volum de tritó que s'ha afegit (0,5).

I amb el nombre de colònies per pouet (ufc/pouet) es calcula l'índex d'adhesió (**Equació 5**) i d'invasió (**Equació 6**).

$$\text{Índex d'adhesió} = \frac{ufc/pouet}{bacteris inicials}$$

Equació 5. Índex d'adhesió: nº de bacteris finals (ufc/pouet) entre el nº de bacteris inicials afegits al pouet.

$$\text{Índex d'invasió (\%)} = \frac{ufc/pouet}{bacteris inicials} \times 100$$

Equació 6. Índex d'invasió (%): nº de colònies per pouet (ufc/pouet) entre el nº de bacteris inicials.

3. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES

Per dur a terme les anàlisis estadístiques s'ha fet servir el programa GraphPad Prism (www.graphpad.com). En primer lloc, es va analitzar la normalitat de les dades usant el test *Shapiro-Wilk*, i es van usar testos paramètrics quan les dades eren normals i no paramètrics quan no ho eren. Per als resultats extrets de la bibliografia es va fer el test no paramètric de *Mann-Whitney U* per veure si hi havia diferències significatives entre els resultats publicats de la LF82 i la K12. Pel que fa als resultats experimentals, per l'adhesió es van comparar les dades de forma aparellada usant un *paired t-test* i de forma no aparellada, usant una *t-Student*. Per la invasió es va usar una *t-Student* o un *Mann-Whitney U* segons s'indica en el text. Per determinar si hi ha diferències significatives s'ha considerat un *p-valor* < 0,05.

RESULTATS

1. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

1.1 Resultats de la cerca bibliogràfica i selecció d'articles per l'estudi

La cerca bibliogràfica realitzada a PubMed ha donat com a resultat un total de 159 articles dels quals sols 31 d'ells ha proporcionat informació rellevant. A la **Figura 5** es pot veure l'esquema d'aquesta selecció.

Dels seleccionats s'han extret els mètodes emprats en l'assaig: tipus de cèl·lules usades (Caco-2 o I-407), temps d'incubació de les cèl·lules abans de l'assaig d'adhesió i/o invasió, MOI, temps d'infecció, concentració d'antibiòtic (AB) i temps d'aplicació d'aquest.

Els motius de no selecció dels 128 articles descartats han sigut principalment que l'experiment no era un assaig d'adhesió ni d'invasió, sinó que eren estudis on es realitzaven mutacions genètiques a les soques per veure les conseqüències en la patogenicitat; estudis immunològics o immunohistoquímics, o treballs fets amb diferents línies cel·lulars a les quals s'analitzen en el treball. A més, tampoc contenien informació dels mètodes emprats pel cultiu cel·lular de Caco-2 o I-407, ni per l'assaig d'adhesió o invasió.

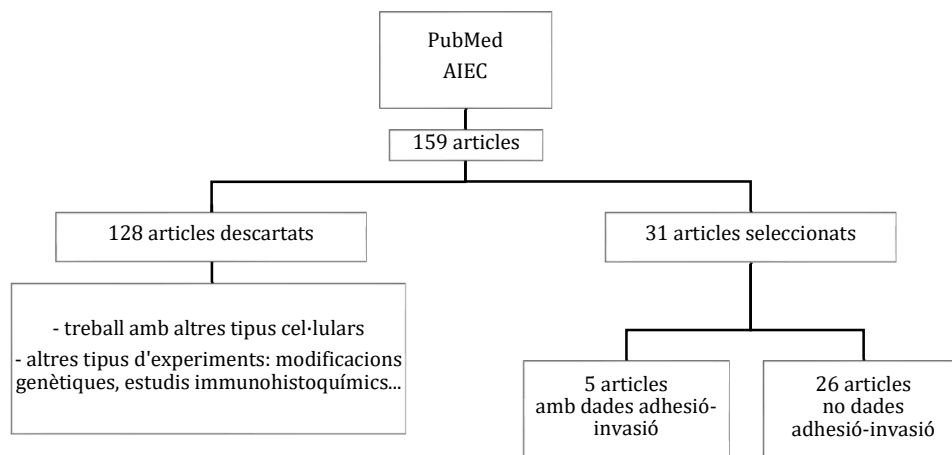


Figura 5. Esquema de la cerca bibliogràfica realitzada al PubMed amb AIEC com a paraula clau, donant com a resultat un total de 159 articles, dels quals 128 han estat descartats i 31 seleccionats que han proporcionat dades dels mètodes emprats, i 6 d'ells també els resultats d'adhesió-invasió.

Aquests articles juntament amb els de la tesi de la Dra. Carla Camprubí (2019) conformen un total de 54. D'aquests s'ha fet una classificació del nombre d'articles per països segons la procedència del grup de recerca que els ha publicat (**Figura 6**). Entre ells es troben: França (17), Estats Units (9), Itàlia (6), Espanya (4), Austràlia (3), Japó (2), Rússia (2), Xile (2), Suècia (1), Canadà (1), Corea del Sud (1), Iran (1), Turquia (1), Regne Unit (1), Polònia (1), Bèlgica (1) i la Xina (1) (ordenats de més a menys publicacions).

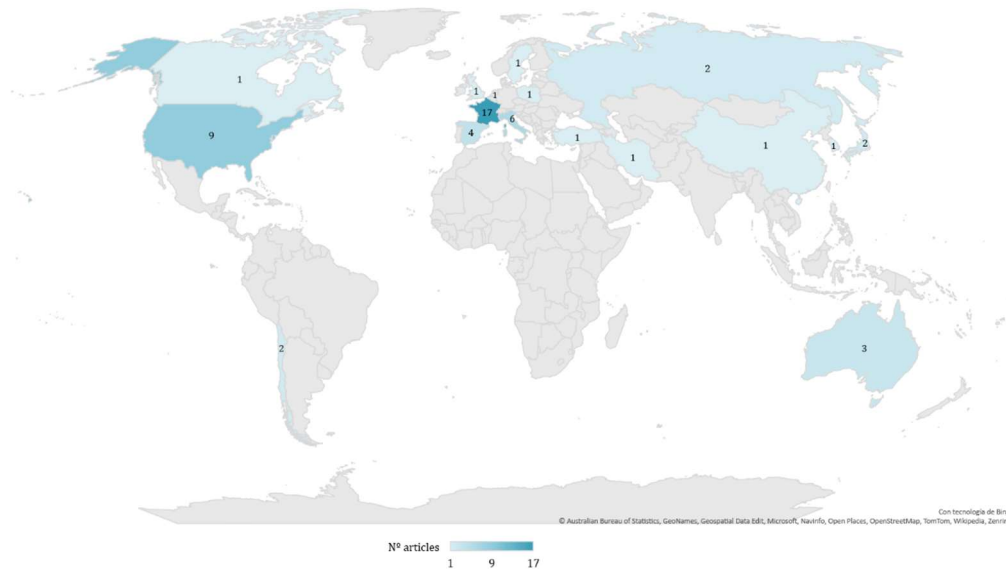


Figura 6. Nº d'articles publicats per països. S'indiquen els articles publicats fins al 25 d'abril de 2024 en els que es determina la capacitat d'adherència i invasió de soques AIEC usant els models cel·lulars Caco-2 i Intestine-407.

A França majoritàriament són dos grups de recerca els que han publicat sobre aquest tema, el grup de la Dra. Darfeuille-Michaud pertanyent a la *Université Clermont Auvergne* (15/17) i el grup de la *Université de Lille* (2/17). Als Estats Units, són diversos els grups de recerca que han publicat en aquest àmbit. El grup que ha publicat més és el grup del Dr. Simpson que pertany a la *Cornell University* (4/9). Tot i que també es troben la *University of Nebraska-Lincoln*, la *University of Texas*, la *University of California*, la *University of North Carolina* i la *Harvard Medical School of Boston*. D'Itàlia les publicacions són principalment de la *Università di Roma* (4/6), i també es troba la *Università di Torino* i el *Istituto Superiore di Sanità*. Finalment, d'Espanya tots provenen del grup de Microbiologia Intestinal de la Universitat de Girona.

1.2 Diversitat de mètodes emprats per determinar l'adhesió i invasió de les soques

Dels 54 articles seleccionats, en 40 s'han fet servir les cèl·lules Caco-2 (74,1%) i a 15 les I-407 (27,8%), tenint en compte que a dos articles es feien servir ambdues línies com a models cel·lulars. A un article no s'especificava el tipus cel·lular utilitzat als assajos. D'aquests articles s'han extret les dades corresponents als mètodes: MOI, temps d'infecció, concentració, temps amb AB i el temps d'incubació de les cèl·lules per l'assaig d'invasió i d'adhesió (**Taula 3**).

Taula 3. Nº d'articles dels quals s'ha extret informació, categoritzats per les variables d'estudi: tipus cel·lular, MOI, temps d'infecció (T inf, en hores), concentració d'AB ([AB], µg/mL), temps d'incubació amb antibiòtic (T AB, en hores), temps d'incubació de les cèl·lules a la placa (T inc. cèl. adhesió, en hores) per l'assaig d'invasió i d'adhesió.

Tipus cel·lular	MOI	T inf (h)	[AB] (µg/mL)	T AB (h)	T inc. cèl. invasió (h)	T inc. cèl. adhesió (h)
Caco-2	39	40	35	36	19	8
I-407	15	15	15	15	13	6

Tot i disposar de 40 articles en els quals es van usar les Caco-2 i 15 per les I-407 no hem obtingut totes les dades dels paràmetres que s'analitzen per a molts d'aquests (**Taula 3**). Aquest fet evidencia que els protocols no estan ben definits als articles.

Una de les variables que hem analitzat és el temps d'incubació de les cèl·lules a la placa on es duu a terme l'assaig. Hem observat que aquest temps varia segons el tipus cel·lular amb el qual es treballa i el tipus d'assaig (adhesió o invasió).

En el cas de les cèl·lules I-407, el temps d'incubació per l'assaig d'adhesió és generalment entre 20 h (N=3) i 24 h (N=3) (entre parèntesis el nombre d'articles) (Barnich et al. (2004); Bonet-Rossinyol et al. (2023); Boudeau et al. (2001); Darfeuille-Michaud et al. (2004); Martinez-Medina et al. (2009); Mayorgas et al. (2021)). Per l'assaig d'invasió aquest temps és sovint també de 20 h (N=10) o 24 h (N=2), tot i que en un cas és de 48 h (Barnich et al. (2004); Bonet-Rossinyol et al. (2023); Boudeau et al. (1999); Boudeau et al. (2001); Chassaing i Darfeuille-Michaud (2013); Costa et al. (2020); Darfeuille-Michaud et al. (2004); de Sousa Figueiredo et al. (2021); Lapaquette et al. (2010); López-Siles et al. (2022); Martinez-Medina et al. (2009); Mayorgas et al. (2021); Rolhion et al. (2007)). En el cas de les Caco-2, el temps d'incubació varia molt en funció del tipus d'assaig. Pel que fa a l'assaig d'adhesió en les Caco-2 (**Figura 7A**), s'ha observat que hi ha una gran variabilitat entre els estudis, essent en alguns casos de 48 h (N=2), de 360 h (N=2), de 24 h (N=1), de 72 h (N=1), de 96 h (N=1) i de 240-264 h (N=1) (Beata et al. (2021); Bonfiglio et al. (2019); Chervy et al. (2022); Chokr et al. (2021); Darfeuille-Michaud et al. (2004); Eaves-Pyles et al. (2008); Fang et al. (2018); Vazeille et al. (2011)). Però és important destacar que a la majoria dels articles no es va poder trobar aquesta informació (80%). Per l'assaig d'invasió en les Caco-2 (**Figura 7B**), també s'ha observat una variabilitat molt gran en aquest paràmetre: 48 h (N=8), 164 h (N=4) i 24 h (N=1), 72 h (N=1), 96 h (N=1), 336 h (N=1), 168-240 h (N=1), 240-264 h (N=1) i 96-120 h (N=1), tot i que en aquest cas, 48 h va ser el temps més utilitzat (Baumgart et al. (2007); Beata et al. (2021); Bleich et al. (2023); Bonfiglio et al. (2019); Boudeau et al. (1999); Bradford et al. (2024); Céspedes et al. (2017); Chervy et al. (2022); Chokr et al. (2021); Dogan et al. (2014); Dogan et al. (2020); Fanelli et al. (2020); Fanelli et al. (2023); Raso et al. (2018); Simpson et al. (2006); Tanaka et al. (2023); Tanaka et al. (2024); Vazeille et al. (2016); Zhang et al. (2021)). També cal destacar que al 50% dels articles no es va poder trobar aquesta informació.

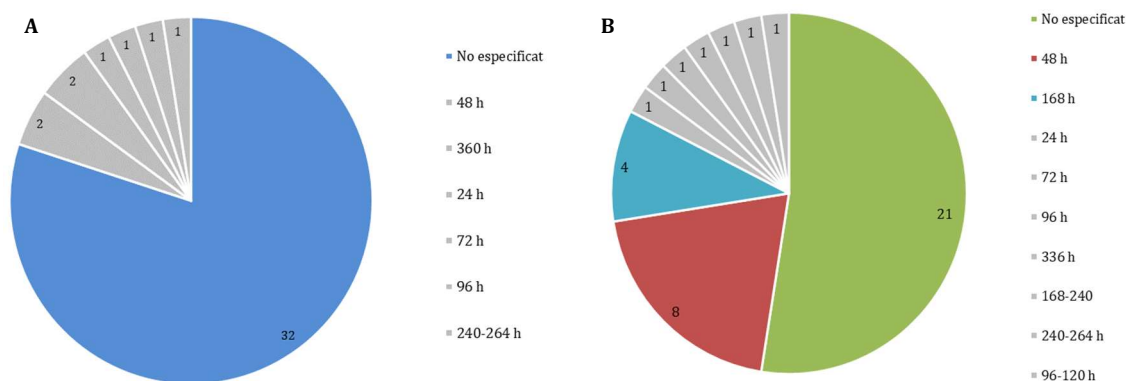


Figura 7. N^o d'articles segons el temps d'incubació de les Caco-2 en placa abans d'iniciar la infecció (h). **A:** N^o d'articles per l'assaig d'adhesió destacant en blau els articles on no s'ha donat aquesta dada. **B:** N^o d'articles per l'assaig d'invasió destacant els tres amb més publicacions: verd (no especificats), roig (48 h) i blau (168 h). Les llegendes estan per ordre seguint l'ordre del gràfic.

Posteriorment, s'han analitzat els diferents "mètodes per l'assaig d'adhesió" descrits. Cal ressaltar que només s'ha pogut obtenir informació al respecte en pocs articles (N= 14, 26%). D'aquests, en un 57,1% dels casos s'usaven les Caco-2 i la resta les I-407. Pel que fa al temps d'infecció, majoritàriament a tots els articles era de 3 h per als dos tipus cel·lulars (69,2%), tot i que en alguns era de 2 h (15,4%), 4 h (7,7%) i 24 h (7,7%).

També s'han classificat els articles per "mètodes per l'assaig d'invasió" tenint en compte les variables: tipus cel·lular, MOI, temps d'infecció (h), concentració d'AB ($\mu\text{g/mL}$) i temps amb AB (h) (**Taula 4**). Cada mètode correspon a una metodologia idèntica respecte a aquestes variables i s'ha classificat amb una lletra diferent. El temps amb antibiòtic no s'ha inclòs en la **Taula 4**, ja que per tots els mètodes era d'una hora, excepte el *Mètode C* que eren 3 h.

Taula 4. Classificació dels diferents mètodes d'invasió segons: tipus cel·lular, MOI, temps d'infecció (T inf) (h), concentració de l'antibiòtic ([AB]) ($\mu\text{g/mL}$) i la referència d'on s'ha extret.

MÈTODE	Tipus cel·lular	MOI	T inf (h)	[AB] ($\mu\text{g/mL}$)	Referència
Mètode A	Caco-2	10	3	100	Abdelhalim et al. (2020); Bertuccini et al. (2014); Boudeau et al. (1999); Darfeuille-Michaud et al. (2004); Hwang et al. (2022); Kamali Dolatabadi et al. (2022); Kittana et al. (2023); Pace et al. (2021); Saitz et al. (2022); Sevrin et al. (2020); Vazeille et al. (2011); Vazeille et al. (2016); Wen et al. (2023)
	I-407				Barnich et al. (2004); Boudeau et al. (1999); Boudeau et al. (2001); Chassaing i Darfeuille-Michaud (2013); Costa et al. (2020); Darfeuille-Michaud et al. (2004); de Sousa Figueiredo et al. (2021); Lapaquette et al. (2010); López-Siles et al. (2022); Martínez-Medina et al. (2009); Mayorgas et al. (2021); O'Brien et al. (2017); Rolhion et al. (2007); Viennois et al. (2020)
Mètode B	Caco-2	20	3	100	Baumgart et al. (2007); Dogan et al. (2014); Dogan et al. (2020); Raso et al. (2018)
Mètode C	Caco-2	1	3	100	Bertuccini et al. (2014)
Mètode D	Caco-2	10	0,5	100	Céspedes et al. (2017)
Mètode E	Caco-2	100	3	50	Eaves-Pyles et al. (2008)
Mètode F	Caco-2	100	2	50	Fang et al. (2018)
Mètode G	Caco-2	10	3	3000	Willing et al. (2009)
Mètode H	Caco-2	100	2	100	Astley et al. (2021)
Mètode I	Caco-2	10	1,5	100	Elhenawy et al. (2019)
Mètode J	Caco-2	10	3	300	Bukato et al. (2019); Pobeguts et al. (2020)

Mètode K	Caco-2	10	2	50	Ormsby et al. (2020)
Mètode L	Caco-2	100	2	150	Bonfiglio et al. (2019); Smit et al. (2022)
Mètode M	Caco-2	100	4 o 5	100	Fanelli et al. (2020); Fanelli et al. (2023)
	I-407				Bonet-Rossinyol et al. (2023)
Mètode N	Caco-2	100	3	100	Boudeau et al. (1999); Chervy et al. (2022); Simpson et al. (2006)
Mètode O	Caco-2	50	3	100	Beata et al. (2021)
Mètode P	Caco-2	100	1,5	150	Bradford et al. (2024)

Tal com s’observa a la **Taula 4**, tant amb les cèl·lules Caco-2 com amb les I-407, el mètode més utilitzat ha estat el **Mètode A (Figura 8A)** el qual la MOI és de 10, el temps d’infecció són 3 h, la concentració d’antibiòtic són 100 µg/mL i el temps amb antibiòtic és 1 h.

Si s’analitzen detalladament les diferents MOI (**Figura 8B**), temps d’infecció (**Figura 8C**) i concentració d’antibiòtic (**Figura 8D**) que s’han emprat per a les Caco-2, es veu que hi ha una gran variabilitat metodològica als articles publicats. Respecte al temps amb antibiòtic la majoria dels articles ha sigut d’1 h (81,6%), a 3 d’ells 3 h i a 4 articles no estava especificat.

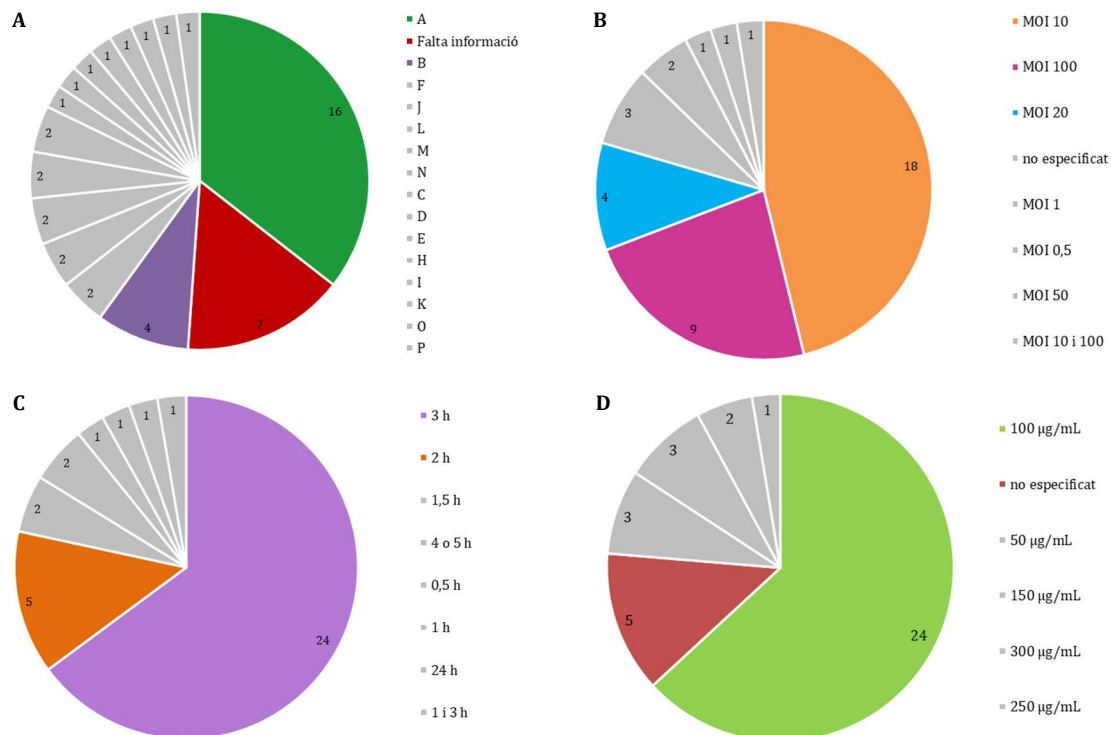


Figura 8. Gràfic amb el nº d’articles publicats dels quals s’obtenen dades dels protocols d’invasió en el model Caco-2 (**Taula 4**). **A:** segons mètode, **B:** segons la MOI, **C:** segons el temps d’infecció (h), **D:** segons la concentració d’AB. A la llegenda es mostren ordenats segons abundància i en color es destaquen els més abundants.

1.3 Diferències entre els índexs d'adhesió i invasió usant les Caco-2 i I-407: resultats de la revisió sistemàtica

Els articles seleccionats a la revisió bibliogràfica 2019-2024 (**Figura 4**), juntament amb els de la tesi de la Dra. Carla Camprubí (2019) conformen un total de 54, dels quals sols de 22 (Caco-2: 15 i I-407: 7) es van poder aconseguir els resultats dels índexs d'adhesió o invasió de la LF82 i la K12. A la resta d'articles (Caco-2: 25 i I-407: 7) aquests índexs no es van obtenir perquè no estaven indicats. Per les Caco-2, no es van poder extreure els resultats dels índexs d'11 articles ja es trobaven en forma de gràfics o estaven en unitats diferents de bact/cèl (adhesió) i % (invasió), i no es podia fer la conversió per falta d'informació. De 2 articles es van obtenir els índexs d'invasió i d'adhesió, d'un sols l'índex d'invasió i d'un altre sols el d'adhesió. I per les I-407, de 6 articles es van poder extreure els índexs d'invasió i d'adhesió i d'un article sols el d'invasió.

A partir de les dades d'aquests articles s'han extret els índexs d'invasió per la línia cel·lular Caco-2 i I-407 (**Figura 9**). Per la soca invasiva LF82, s'observa que els índexs són significativament superiors a la línia cel·lular Caco-2 ($4,773 \pm 2,450$) que a les I-407 ($3,274 \pm 1,542$) ($p\text{-value} = 0,048$); en canvi, per la soca control K12, tot i que les diferències no són significatives estadísticament ($p\text{-value} = 0,072$), s'observa que els índexs també són superiors en les Caco-2 ($0,042 \pm 0,038$) que a les I-407 ($0,005 \pm 0,008$).

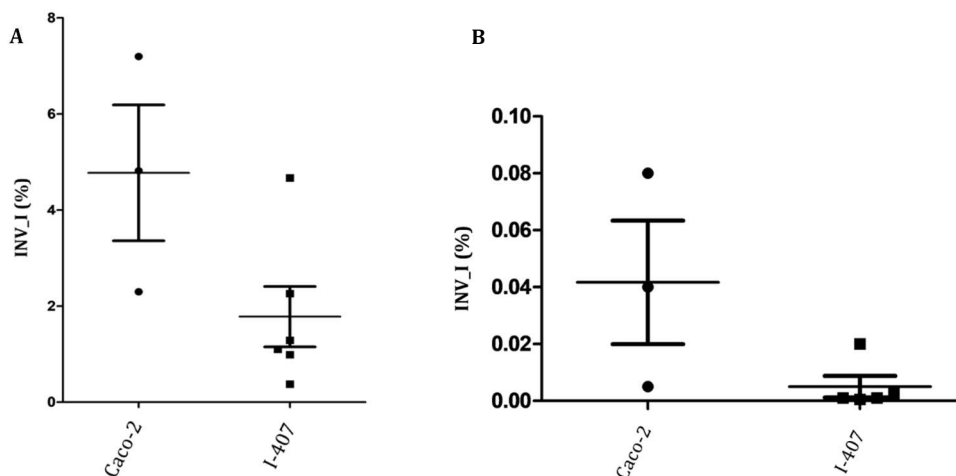


Figura 9. Índexs d'invasió de les soques AIEC LF82 (A) i la comensal K12 (B) en els models cel·lulars d'estudi.

2. RESULTATS EXPERIMENTALS

Les cèl·lules per l'assaig d'adhesió s'han deixat diferenciar-se durant 7 i 15 dies a la placa tal com s'indicava al protocol de Baumgart et al. (2007) i de Darfeuille-Michaud et al. (2004) (**Figura 10**). S'observen les cèl·lules unes al costat de les altres formant la monocapa amb morfologia epitelial. Al cap de 15 dies, les cèl·lules tenen els marges més marcats que al cap de 7 dies, el que podria indicar un nivell de diferenciació superior. Ja que, el procés de diferenciació d'aquestes cèl·lules es dona en patró de mosaic, amb algunes àrees amb cèl·lules completament diferenciades després dels 12-14 dies i altres zones amb cèl·lules menys diferenciades (Lea, 2015).

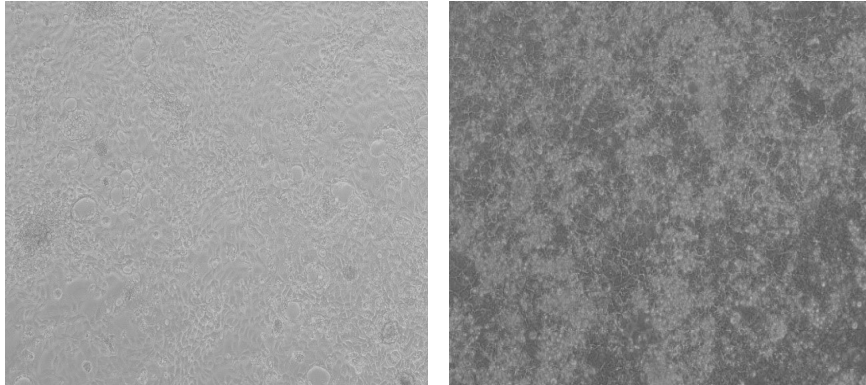


Figura 10. Cèl·lules Caco-2 en la placa a 7 (esquerra) i 15 (dreta) dies de diferenciació observades al microscopi (CKX41, OLYMPUS) Font pròpia.

2.1. Diferències entre els índexs d'adhesió usant les Caco-2 i les I-407

En aquest estudi es van obtenir els índexs d'adhesió del socari AIEC de la Universitat de Girona en el model cel·lular Caco-2, que es va dur a terme en monocapes incubades durant 7 i 15 dies respectivament (**Figura 11**). Aquests valors es van comparar amb els índexs obtinguts prèviament al grup de recerca en el model I-407 (Martinez-Medina et al., 2009).

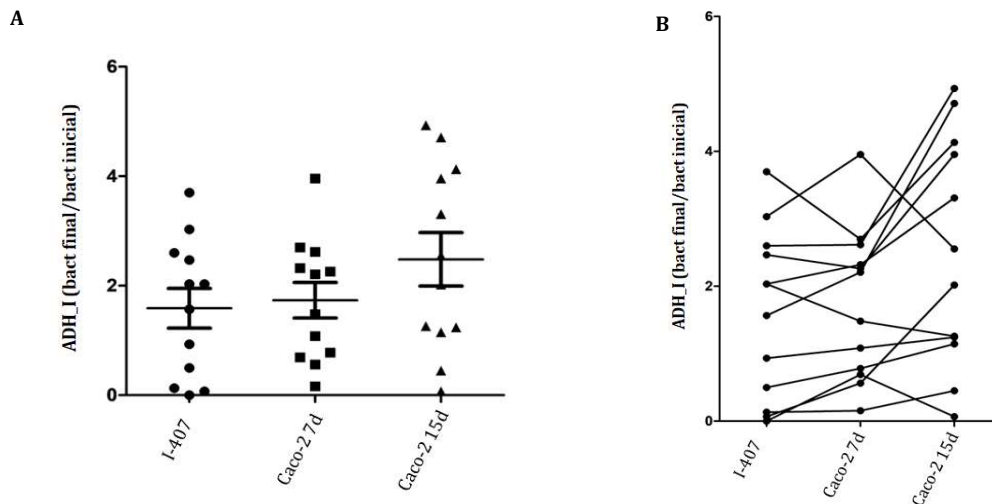


Figura 11. Gràfic índex d'adhesió (bact finals/bact inicials) de cada línia cel·lular I-407 i Caco-2 a 7 i 15 dies. **A:** Gràfic de dades no aparellades dels índexs d'adhesió (bact finals/bact inicials). **B:** Gràfic de dades aparellades dels índexs d'adhesió (bact finals/bact inicials).

Les dades s'han analitzat en conjunt, comparant pel tipus cel·lular i grau de diferenciació de les Caco-2 (**Figura 11A**), i de forma aparellada (**Figura 11B**). En ambdós casos, s'observa que els valors d'adhesió són més elevats per la línia cel·lular Caco-2 a 15 dies en comparació amb les cèl·lules Caco-2 incubades durant 7 dies i les I-407. Per estudiar si hi havia diferències significatives dels índexs d'adherència entre les I-407 i les Caco-2 a 7 i 15 dies s'ha fet un test paramètric per les dades aparellades i no aparellades. Sols el test per les dades aparellades (*paired t-test*) ha donat significatiu entre les I-407 i les Caco-2 a 15 dies amb un *p-value* = 0,023.

2.2. Diferències entre els índexs d'invasió usant les Caco-2 i les I-407

Per l'assaig d'invasió s'ha analitzat l'índex obtingut per les soques AIEC de la col·lecció de Girona i també de les ECG (no-AIEC de l'intestí) i aquestes s'han comparat amb les dades prèvies obtingudes pel grup en les I-407 (Martinez-Medina et al., 2009).

Els resultats obtinguts per les I-407 i les Caco-2 s'observen a la **Figura 12**. Pel que fa als resultats dels índexs de les soques control LF82 i K12, s'observa que són una mica superiors pel model cel·lular Caco-2 (K12: $0,122 \pm 0,042$ i LF82: $1,588 \pm 0,638$) que per les I-407 (K12: $0,002 \pm 0,002$ i LF82: $1,191 \pm 0,403$). Com que es tenien suficients dades d'aquestes soques, s'ha confirmat que hi havia normalitat i s'ha fet el test paramètric de *t-Student*. Per la soca LF82, el test ha confirmat que no existeixen diferències significatives entre les Caco-2 i les I-407 (*p-value*= 0,213). En canvi, per la soca K12, si existeixen diferències significatives entre Caco-2 i I-407 (*p-value* < 0,0001).

Per la resta de soques AIEC, els índexs d'invasió són generalment bastant semblants entre models cel·lulars tot i que per algunes soques s'observa que és superior a les Caco-2. D'aquestes, com hi havia poques dades no es va poder comprovar la normalitat i es va fer un test no paramètric. I es confirma que les soques AIEC 15-1 i AIEC 23 presenten diferències significatives entre les línies cel·lulars amb un *p-value*= 0,024 i *p-value*= 0,009 respectivament. Per l'anàlisi estadística de l'AIEC 12 es van treure els valors més extrems i en conseqüència ens hem quedat tant sols amb dos valors i no podem obtenir significació estadística.

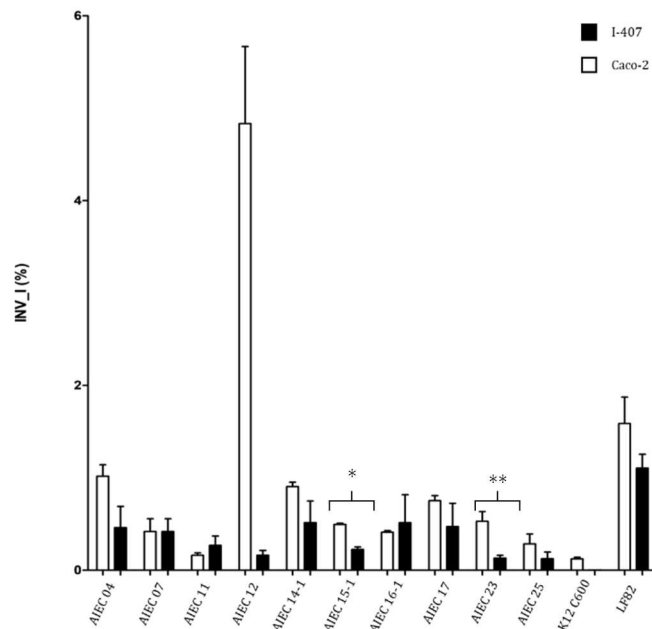


Figura 12. Gràfic índex d'invasió (%) de cada soca AIEC, K12 i LF82 en les línies cel·lulars Caco-2 (blanc) i I-407 (negre). Les diferències significatives s'indiquen amb asteriscs: *($p < 0.5$ i > 0.1), **($p < 0.01$ i > 0.001).

Pel que fa a l'assaig d'invasió a les soques ECG (no-AIEC) observem els resultats dels índexs a la **Figura 13**. Per la línia cel·lular Caco-2 els valors són sorprenentment molt més elevats que a les I-407. Aquest resultat no s'esperava, ja que aquestes soques no són invasives. Respecte a l'anàlisi estadística dels resultats, no s'ha pogut realitzar perquè no s'han aconseguit dades suficients de les ECG a les I-407.

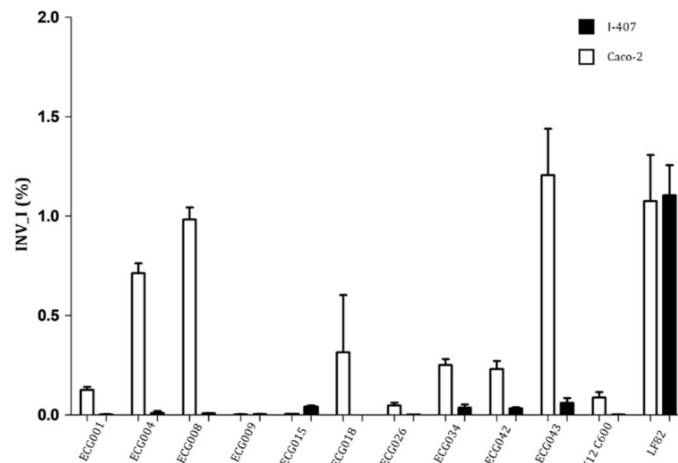


Figura 13. Gràfic índex d'invasió (%) de cada soca ECG, K12 i LF82 en les línies cel·lulars Caco-2 (blanc) i I-407 (negre).

DISCUSSIÓ

1. DISCUSSIÓ DE L'APARTAT BIBLIOGRÀFIC

1.1 Diversitat de mètodes emprats per a la identificació del patotip AIEC

L'estudi de l'AIEC comença a França a finals de la dècada dels 90, Darfeuille-Michaud i col·laboradors publiquen un estudi on s'aïllen soques d'*E. coli* adherents de pacients amb malaltia de Crohn (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Més tard, es descobreix que aquestes soques també són invasives, i es proposa l'*Escherichia coli* adherent-invasiva (AIEC) com a nou patotip d'*E. coli* (Darfeuille-Michaud et al., 2004). Des d'aquest moment fins ara, els francesos són els que més han publicat sobre AIEC, però actualment aquesta temàtica està agafant molta importància, i ja són diversos els grups arreu del món que han començat a treballar en aquest camp de recerca.

En aquest treball s'ha dut a terme una revisió bibliogràfica dels mètodes usats per a la identificació del patotip AIEC, centrant-nos en aquells que usen com a model cel·lular Caco-2 i I-407, les línies cel·lulars més freqüents. Els articles obtinguts d'aquesta cerca provenen d'autors que investiguen a diferents països, entre ells: França, Estats Units, Itàlia, Espanya, Austràlia, Japó, Rússia, Xile, Suècia, Canadà, Corea del Sud, Iran, Turquia, Regne Unit, Polònia, Bèlgica i la Xina. D'aquests, els que més publicacions tenen seguit de França són els Estats Units, Itàlia i Espanya. Cal destacar que hi ha moltes més publicacions sobre AIEC en les que es fan servir altres tipus cel·lulars per a la identificació del patotip o que se centren en l'estudi de l'AIEC des d'altres perspectives i que no s'han tingut en compte en aquest treball (Barnich et al., 2007; Camprubí-Font et al., 2019; Mansour et al., 2023; Martínez-Medina et al., 2009; Nag et al., 2022; Pamela et al., 2021; Saitz et al., 2022).

Pel que fa a les línies cel·lulars s'observa que a un 74,1% d'articles revisats fan servir les Caco-2 i a un 27,8% les I-407. A més de la variabilitat respecte al model cel·lular, també hi ha molta variabilitat pel que fa a les variables dels protocols (temps d'incubació de les cèl·lules, MOI, temps d'infecció, concentració d'antibiòtic i temps d'aquest) segons si l'assaig que es duu a terme és d'adhesió o d'invasió. Cal destacar que dels diferents mètodes emprats, per al model cel·lular Caco-2 s'ha observat molta més variabilitat que per les I-407. Pel que fa al temps d'incubació de les cèl·lules, per l'assaig d'adhesió, quan s'usa el model cel·lular I-407 és quasi sempre de 20 o 24 h, en canvi, per les Caco-2 el més freqüent és de 48 o 360 h. Per l'assaig d'invasió, per al model cel·lular I-407 és de 20 h i per les Caco-2 són 48 h majoritàriament. Pel que fa a les variables MOI, temps d'infecció, temps amb antibiòtic i la concentració d'aquest, s'ha vist que a la majoria d'aquests articles es fa servir el mateix protocol per les dues línies cel·lulars i també per l'assaig d'adhesió i d'invasió. La MOI és de 10, el temps d'infecció de 3 hores, i el temps i concentració d'antibiòtic d'1 hora i 100 µg/mL (aquesta darrera dada només aplica a l'assaig d'invasió).

De manera que el protocol més emprat per l'assaig d'adhesió és amb un temps d'incubació de 20-24 h per les I-407 i de 48 i 360 h per les Caco-2 i amb una MOI és 10, el temps d'infecció són 3 h tant a les I-407 i les Caco-2. I per l'assaig d'invasió, el temps d'incubació més freqüent és de 20 h per les I-407 i de 48 h per les Caco-2, i el mètode que més es fa servir per a les dues línies cel·lulars és amb una MOI és 10, el temps d'infecció són 3 h, la concentració d'antibiòtic són 100 µg/mL i el temps amb aquest és d'1 h.

Un altre fet que cal destacar és que a la majoria dels articles consultats falten molts detalls dels protocols que es fan servir per als assajos d'adhesió i d'invasió, a més que, com s'ha vist, existeix una gran variabilitat de protocols. Aquesta falta d'informació i variabilitat, confirma que existeix una falta d'estandardització entre mètodes. Donada aquesta falta, els índexs d'adhesió i invasió de les soques són molt variables entre els grups de recerca (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020). Per això, cal unificar les metodologies que fan servir tots els grups que dediquen la seva recerca a l'AIEC per tal que siguin reproduïbles i els resultats que es publiquin siguin comparables. Un cop s'arribi a un consens amb els mètodes, s'haurien de provar en les diverses col·leccions de soques de les diferents regions del món per tal que les soques AIEC estiguin ben identificades (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020).

1.2 Índexs d'adhesió i invasió de dues soques control en Caco-2 i I-407 publicats en treballs previs

En aquesta part s'han analitzat els resultats dels índexs publicats pels diferents investigadors de les soques K12 i LF82 a les dues línies cel·lulars per a analitzar si existeixen diferències respecte al model cel·lular.

Una observació que hem fet durant la recerca d'aquestes dades a la bibliografia és que els índexs d'adhesió i d'invasió no estaven indicats a totes les publicacions, de vegades es donaven les dades directament en un gràfic. També de vegades es trobaven els índexs amb unitats diferents i la informació que es donava a l'article no permetia obtenir els valors amb les mateixes unitats. Això no va permetre realitzar una comparació tan àmplia dels índexs en les dues línies cel·lulars com s'esperava. Tot i això, dels resultats que es van obtenir, s'observa que el nivell d'invasió és superior a les Caco-2 que a les I-407 per les soques LF82 i K12.

Actualment, la variabilitat que hi ha entre els mètodes, les línies cel·lulars i l'origen de les soques que s'utilitzen entre els diferents grups, pot conduir a una identificació diferent o errònia de l'AIEC (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020). En aquest cas, el fet que els índexs que s'obtenen per la soca de referència LF82 i la soca control K12 siguin diferents entre els dos models cel·lulars fa pensar que a un model una soca pugui ser classificada com a invasiva i, en canvi, a l'altre no. Això és especialment preocupant sobretot a les soques que presenten un índex baix, pròxim al llindar que classifica una soca com adherent/invasiva (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020). Per comprovar-ho, es va dur a terme l'assaig d'invasió i adhesió a diferents soques AIEC i no-AIEC als dos models cel·lulars per estudiar si també existien aquestes diferències.

2. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS EXPERIMENTALS

A la part experimental s'han analitzat 10 soques AIEC i 10 soques no-AIEC fent servir dos mètodes diferents segons el model cel·lular. Per les Caco-2 per l'assaig d'adhesió s'han deixat incubant les cèl·lules durant 7 dies i s'ha fet servir el mètode amb una MOI de 20 (tenint en compte el nombre de cèl·lules inoculades el primer dia) i 3 h d'infecció; i pel d'invasió s'han incubat les cèl·lules durant 2 dies i l'assaig s'ha realitzat amb una MOI de 20 (tenint en compte el nombre de cèl·lules inoculades el primer dia), 3 h d'infecció i 100 µg/mL d'antibiòtic i durant 1 h. Per les I-407, per l'assaig d'adhesió les cèl·lules s'han incubat durant 20-24 h i s'ha emprat el mètode amb una MOI de 10 i 3 h d'infecció; i pel d'invasió les cèl·lules s'han incubat 20-24 h i s'ha fet servir el mètode amb una MOI de 10, 3 h d'infecció i 100 µg/mL d'antibiòtic i durant 1 h.

En aquest estudi vam confirmar que les soques AIEC definides a partir del model I-407 també es confirmen com a invasives en el model Caco-2. Pel que fa als resultats d'invasió, els índexs han sigut bastant semblants entre els dos models cel·lulars. Així i tot, s'observen una mica superiors al model Caco-2 que I-407, però sols existeixen diferències significatives per les soques AIEC 15-1 i AIEC 23 i la soca control K12. Pels assajos d'adhesió, s'ha observat un índex superior a les Caco-2 amb un major grau de diferenciació (incubades durant 15 dies) respecte a les Caco-2 incubades durant 7 dies i també superior als índexs obtinguts amb les I-407. Però, cal tenir en compte que en aquest assaig, la MOI ha estat molt baixa, ja que es van infectar a una MOI de 20 tenint en compte el nombre inicial de cèl·lules a la placa, però el nombre de cèl·lules va augmentar després de 7 i 15 dies d'incubació. Tot i això, donat que la MOI és inferior esperaríem que el nombre de bacteris adherits per cèl·lula fos inferior

també, però justament és superior i, per tant, confirma que les soques adhereixen millor els cultius de Caco-2 més diferenciades que no pas les mateixes cèl·lules en estadis més indiferenciats o les cèl·lules I-407. Aquests resultats no concorden amb un estudi semblant realitzat per Sarem et al. (1995) on es comparava el nivell d'adhesió de tres soques diferents de *Lactobacillus* en les dues línies cel·lulars Caco-2 i I-407, van observar que els nivells d'adhesió eren superiors a les I-407 (incubades durant 5 dies) respecte a les Caco-2 incubades durant 21 dies. Però, com que les soques que fan servir són diferents, els mecanismes de colonització d'aquestes poden ser diferents dels de l'AIEC.

Donat que l'índex d'adhesió se sol donar com a bacteris/cèl·lula hoste, i que interessa fer una MOI ajustada, considerem que de cara a futurs estudis és important fer un recompte de les cèl·lules en el moment de la infecció o bé confirmar que el temps de duplicació és de 62 h, tal com indica la casa comercial ATCC. Aquest recompte no és molt complex, però resulta molt laboriós de realitzar. Els mètodes utilitzats per recomptar el nombre de cèl·lules inclouen comptar amb un hemocitòmetre o un comptador electrònic (de Coulter), mesurar el pes de la cèl·lula seca o humida, el volum cel·lular i el contingut de DNA o de proteïnes totals (Zwicker et al., 1996). Finalment, per tenir una comparació dels resultats rigorosa, també caldria realitzar assajos amb una MOI semblant a les I-407.

Respecte a les soques no-AIEC, els resultats obtinguts en la línia cel·lular Caco-2 han sigut molt sorprenents, ja que tot i no ser soques invasives, els índexs d'invasió obtinguts a la majoria d'aquestes han sigut superiors a 0,1%. Per tant, com indica la definició del patotip (Darfeuille-Michaud et al., 2004) s'haurien de classificar com AIEC. Creiem que aquests resultats tan elevats poden ser deguts a un problema durant la realització de l'assaig, ja que a diferència de les AIEC, les monocapes de les cèl·lules es replegaven o es desenganxaven més fàcilment del pouet de la placa després de la infecció. Pensem que possiblement l'antibiòtic afegit posteriorment no hagi pogut eliminar bé tots els bacteris adherits extracel·lularment i aquests s'han inclòs en el recompte de colònies com a bacteris intracel·lulars. Aquesta hipòtesi s'hauria de contrastar amb més assajos i altres tècniques, com l'observació al microscopi de les monocapes o analitzar l'efecte de l'antibiòtic amb les monocapes replegades, per veure si realment ha estat aquest el problema. A més, veient que els resultats han sigut bastant elevats i que hem tingut problemes amb les monocapes, es podria provar d'ajustar el protocol a una MOI de 10, que també és de les més utilitzades per l'assaig d'invasió, per comprovar si amb aquest canvi les monocapes es veurien menys afectades i s'obtindrien resultats més acurats.

Tal com s'ha pogut comprovar amb les no-AIEC, cal adaptar els protocols perquè els resultats que siguin indiferents al tipus cel·lular que es faci servir, ja que els dos models analitzats són els més emprats per a la identificació d'AIEC. Per això, s'han de realitzar més assajos i establir un protocol consens que permeti l'adequada caracterització del patotip, molt important sobretot a les soques amb índexs al límit del valor per tal de ser considerades AIEC. A més, un cop obtingut el protocol estandarditzat, s'haurien de realitzar estudis fent servir les diverses col·leccions de soques de diferents regions geogràfiques (Camprubí-Font i Martínez-Medina, 2020) per assegurar que estan ben classificades.

CONCLUSIÓ

Following the objectives proposed in this work and the results obtained, we can conclude that:

1. There is a lack of information in the bibliography about the particularities of the protocols used to test the AIEC phenotype and the results obtained from the adhesion and invasion indices.
2. There is a considerable variation in the methods used to test the adhesion and invasion of *E. coli* strains, despite there are some protocols that are more popular, one based on Caco-2 and the other on I-407 cells.
3. For the adhesion test, the most used method is with an incubation time of 20 or 24 h for I-407 cells and 48 or 360 h for Caco-2 cells, and for both cell lines the method is a MOI of 10 and an infection time of 3 h. For the invasion assay, the most used method is with an incubation time of 20 h for I-407 cells and 48 h for Caco-2 cells following with a MOI of 10, an infection time of 3 h, an antibiotic concentration of 100 µg/mL and an antibiotic time of 1 h for both cell lines.
4. According to the results reported in the literature, the indices of the AIEC reference strain LF82 and the control strain K12 are higher in the Caco-2 cell type than in the I-407 cells, however the differences are only significant in the LF82 strain.
5. AIEC strains identified using I-407 model in Girona were confirmed as adherent and invasive in the Caco-2 model.
6. The adhesion levels of AIEC strains were higher in Caco-2 differentiated cells than in I-407 or Caco-2 less differentiated.
7. Mostly non-AIEC strains showed higher invasion levels than expected in Caco-2 model, being classified as invasive. Further tests are required to confirm/refute this result.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelhalim, K. A., Uzel, A., & Gülşen Ünal, N. (2020). Virulence determinants and genetic diversity of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains isolated from patients with Crohn's disease. *Microbial Pathogenesis*, 145, 104233. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104233>
- Astley, D. J., Masters, N., Kuballa, A., & Katouli, M. (2021). Commonality of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from patients with extraintestinal infections, healthy individuals and the environment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(1), 181-192. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04066-5>
- Ballester Ferré, M. P., Boscá-Watts, M. M., & Mínguez Pérez, M. (2018). Enfermedad de Crohn. *Medicina Clínica*, 151(1), 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.10.036>
- Barnich, N., Bringer, M.-A., Claret, L., & Darfeuille-Michaud, A. (2004). Involvement of Lipoprotein NlpI in the Virulence of Adherent Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease. *Infection and Immunity*, 72(5), 2484-2493. <https://doi.org/10.1128/iai.72.5.2484-2493.2004>
- Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1566-1574. <https://doi.org/10.1172/JCI30504>
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R. H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S. G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., & Simpson, K. W. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *The ISME Journal*, 1(5), 403-418. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.52>
- Beata, S., Michał, T., Mateusz, O., Urszula, W., Choroszy, M., Andrzej, T., & Piotr, D. (2021). Norepinephrine

- affects the interaction of adherent-invasive *Escherichia coli* with intestinal epithelial cells. *Virulence*, 12(1), 630-637. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1882780>
- Bertuccini, L., Costanzo, M., Iosi, F., Tinari, A., Terruzzi, F., Stronati, L., Aloï, M., Cucchiara, S., & Superti, F. (2014). Lactoferrin prevents invasion and inflammatory response following *E. coli* strain LF82 infection in experimental model of Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, 46(6), 496-504. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.02.009>
- Bleich, R. M., Li, C., Sun, S., Barlogio, C. J., Broberg, C. A., Franks, A. R., Bulik-Sullivan, E., Dogan, B., Simpson, K. W., Carroll, I. M., Fodor, A. A., & Arthur, J. C. (2023). A consortia of clinical *E. coli* strains with distinct in-vitro adherent/invasive properties establish their own co-colonization niche and shape the intestinal microbiota in inflammation-susceptible mice. *Research Square*, rs.3.rs-2899665. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2899665/v1>
- Bonet-Rossinyol, Q., Camprubí-Font, C., López-Siles, M., & Martínez-Medina, M. (2023). Identification of differences in gene expression implicated in the Adherent-Invasive *Escherichia coli* phenotype during in vitro infection of intestinal epithelial cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1228159>
- Bonfiglio, G., Neroni, B., Radochia, G., Pompilio, A., Mura, F., Trancassini, M., Di Bonaventura, G., Pantanella, F., & Schippa, S. (2019). Growth Control of Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) by the Predator Bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus*: A New Therapeutic Approach for Crohn's Disease Patients. *Microorganisms*, 8(1), 17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010017>
- Boudeau, J., Barnich, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1272-1284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x>
- Boudeau, J., Glasser, A.-L., Masseret, E., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease. *Infection and Immunity*, 67(9), 4499-4509. <https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4499-4509.1999>
- Bradford, G., Asgari, B., Smit, B., Hatje, E., Kuballa, A., & Katouli, M. (2024). The Efficacy of Selected Probiotic Strains and Their Combination to Inhibit the Interaction of Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) with a Co-Culture of Caco-2:HT29-MTX Cells. *Microorganisms*, 12(3), 502. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030502>
- Bukato, O., Pobeguts, O., Rakitina, D., Baikova, J., Butenko, I., Silantsev, A., Fisunov, G., & Govorun, V. (2019). Proteomic dataset: Profiling of membrane fraction of *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients after adhesion and invasion experiments. *Data in Brief*, 27, 104417. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104417>
- Caco-2 [Caco2]—HTB-37 | ATCC. (s.d.). Recuperat 11 maig 2024, de <https://www.atcc.org/products/htb-37>
- Camprubí-Font, C., Ewers, C., Lopez-Siles, M., & Martínez-Medina, M. (2019). Genetic and Phenotypic Features to Screen for Putative Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00108>
- Camprubí-Font, C., & Martínez-Medina, M. (2020). Why the discovery of adherent-invasive *Escherichia coli* molecular markers is so challenging? *World Journal of Biological Chemistry*, 11(1), 1-13. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v11.i1.1>
- Céspedes, S., Saitz, W., Del Canto, F., De la Fuente, M., Quera, R., Hermoso, M., Muñoz, R., Ginard, D., Khorrani, S., Girón, J., Assar, R., Rosselló-Mora, R., & Vidal, R. M. (2017). Genetic Diversity and Virulence Determinants of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Crohn's Disease in Spain and Chile. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.00639>
- Chassaing, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2013). The σE Pathway Is Involved in Biofilm Formation by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(1), 76-84. <https://doi.org/10.1128/JB.01079-12>
- Chervy, M., Sivignon, A., Dambrine, F., Buisson, A., Sauvanet, P., Godfraind, C., Allez, M., Le Bourhis, L., The Remind Group, Barnich, N., & Denizot, J. (2022). Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients. *Gut Microbes*, 14(1), 2127444. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2127444>
- Chokr, D., Cornu, M., Neut, C., Bortolus, C., Charlet, R., Desreumaux, P., Specca, S., & Sendid, B. (2021). Adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain LF82, but not *Candida albicans*, plays a profibrogenic

- role in the intestine. *Gut Pathogens*, 13(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00401-z>
- Conte, M. P., Longhi, C., Marazzato, M., Conte, A. L., Aleandri, M., Lepanto, M. S., Zagaglia, C., Nicoletti, M., Aloï, M., Totino, V., Palamara, A. T., & Schippa, S. (2014). Adherent-invasive Escherichia coli (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: Phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Research Notes*, 7(1), 748. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-748>
- Costa, R. F. A., Ferrari, M. L. A., Bringer, M.-A., Darfeuille-Michaud, A., Martins, F. S., & Barnich, N. (2020). Characterization of mucosa-associated Escherichia coli strains isolated from Crohn's disease patients in Brazil. *BMC Microbiology*, 20(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01856-x>
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., & Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127(2), 412-421. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>
- de Sousa Figueiredo, M. B., Pradel, E., George, F., Mahieux, S., Houcke, I., Pottier, M., Fradin, C., Neut, C., Daniel, C., Bongiovanni, A., Foligné, B., & Titécat, M. (2021). Adherent-Invasive and Non-Invasive Escherichia coli Isolates Differ in Their Effects on Caenorhabditis elegans' Lifespan. *Microorganisms*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091823>
- Dogan, B., Suzuki, H., Herlekar, D., Sartor, R. B., Campbell, B. J., Roberts, C. L., Stewart, K., Scherl, E. J., Araz, Y., Bitar, P. P., Lefébure, T., Chandler, B., Schukken, Y. H., Stanhope, M. J., & Simpson, K. W. (2014). Inflammation-associated Adherent-invasive Escherichia coli Are Enriched in Pathways for Use of Propanediol and Iron and M-cell Translocation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(11), 1919-1932. <https://doi.org/10.1097/MIB.000000000000183>
- Dogan, B., Zhang, S., Kalla, S. E., Dogan, E. I., Guo, C., Ang, C. R., & Simpson, K. W. (2020). Molecular and Phenotypic Characterization of Escherichia coli Associated with Granulomatous Colitis of Boxer Dogs. *Antibiotics*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090540>
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C., Colombel, J.-F., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., & Barnich, N. (2013). Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003141. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003141>
- Eaves-Pyles, T., Allen, C. A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C. B., Eric Jezek, G., Islas-Islas, M., & Torres, A. G. (2008). Escherichia coli isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(5), 397-409. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.05.011>
- Elhenawy, W., Tsai, C. N., & Coombes, B. K. (2019). Host-Specific Adaptive Diversification of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 301-312.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.010>
- Fanelli, G., Pasqua, M., Colonna, B., Prosseda, G., & Grossi, M. (2020). Expression Profile of Multidrug Resistance Efflux Pumps During Intracellular Life of Adherent-Invasive Escherichia coli Strain LF82. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1935. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01935>
- Fanelli, G., Pasqua, M., Prosseda, G., Grossi, M., & Colonna, B. (2023). AcrAB efflux pump impacts on the survival of adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 inside macrophages. *Scientific Reports*, 13(1), 2692. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29817-0>
- Fang, X., Monk, J. M., Nurk, S., Akseshina, M., Zhu, Q., Gemmell, C., Gianetto-Hill, C., Leung, N., Szubin, R., Sanders, J., Beck, P. L., Li, W., Sandborn, W. J., Gray-Owen, S. D., Knight, R., Allen-Vercoe, E., Palsson, B. O., & Smarr, L. (2018). Metagenomics-Based, Strain-Level Analysis of Escherichia coli From a Time-Series of Microbiome Samples From a Crohn's Disease Patient. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.02559>
- Harmonizome. (s.d.). [dataset]. Recuperat 25 juny 2024, de <https://maayanlab.cloud/Harmonizome/>
- Hwang, Y. J., Jo, J., Kim, E., Yoon, H., Hong, H., Kim, M. S., & Myung, H. (2022). Motility increase of adherent invasive Escherichia coli (AIEC) induced by a sub-inhibitory concentration of recombinant endolysin LysPA90. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1093670>
- intestine 407—CCL-6 / ATCC. (s.d.). Recuperat 11 maig 2024, de <https://www.atcc.org/products/ccl-6>
- Kamali Dolatabadi, R., Fazeli, H., Emami, M. H., Karbasizade, V., Maghool, F., Fahim, A., & Rahimi, H. (2022). Phenotypic and Genotypic Characterization of Clinical Isolates of Intracellular Adherent-Invasive

- Escherichia coli Among Different Stages, Family History, and Treated Colorectal Cancer Patients in Iran. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.938477>
- Kittana, H., Gomes-Neto, J. C., Heck, K., Juritsch, A. F., Sughroue, J., Xian, Y., Mantz, S., Segura Muñoz, R. R., Cody, L. A., Schmaltz, R. J., Anderson, C. L., Moxley, R. A., Hostetter, J. M., Fernando, S. C., Clarke, J., Kachman, S. D., Cressler, C. E., Benson, A. K., Walter, J., & Ramer-Tait, A. E. (2023). Evidence for a Causal Role for Escherichia coli Strains Identified as Adherent-Invasive (AIEC) in Intestinal Inflammation. *mSphere*, 8(2), e0047822. <https://doi.org/10.1128/msphere.00478-22>
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R. J., & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cellular Microbiology*, 12(1), 99-113. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x>
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. En K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Ed.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In vitro and ex vivo models*. Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/>
- Lin, J., Chen, L., Jiang, W., Zhang, H., Shi, Y., & Cai, W. (2019). Rapid detection of low-level HeLa cell contamination in cell culture using nested PCR. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(1), 227-236. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13923>
- López-Siles, M., Camprubí-Font, C., Gómez del Pulgar, E. M., Sabat Mir, M., Busquets, D., Sanz, Y., & Martínez-Medina, M. (2022). Prevalence, Abundance, and Virulence of Adherent-Invasive Escherichia coli in Ulcerative Colitis, Colorectal Cancer, and Coeliac Disease. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.748839>
- Low, D., Tran, H. T., Lee, I.-A., Dreux, N., Kamba, A., Reinecker, H.-C., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., & Mizoguchi, E. (2013). Chitin-Binding Domains of Escherichia Coli ChiA Mediate Interactions With Intestinal Epithelial Cells in Mice With Colitis. *Gastroenterology*, 145(3), 602-612.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.017>
- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A., & Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(9), 1463-1467. <https://doi.org/10.5858/133.9.1463>
- Mansour, S., Asrar, T., & Elhenawy, W. (2023). The multifaceted virulence of adherent-invasive Escherichia coli. *Gut Microbes*, 15(1), 2172669. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2172669>
- Martínez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J. E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., & García-Gil, L. J. (2009). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli(AIEC). *BMC Microbiology*, 9(1), 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-202>
- Martínez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, J., García-Gil, J. L., & Darfeuille-Michaud, A. (2009). Molecular Diversity of Escherichia Coli in the Human Gut: New Ecological Evidence Supporting the Role of Adherent-Invasive E. Coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(6), 872-882. <https://doi.org/10.1002/ibd.20860>
- Mayorgas, A., Dotti, I., Martínez-Picola, M., Esteller, M., Bonet-Rossinyol, Q., Ricart, E., Salas, A., & Martínez-Medina, M. (2021). A Novel Strategy to Study the Invasive Capability of Adherent-Invasive Escherichia coli by Using Human Primary Organoid-Derived Epithelial Monolayers. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.646906>
- Nag, D., Farr, D., Raychaudhuri, S., & Withey, J. H. (2022). An adult zebrafish model for adherent-invasive Escherichia coli indicates protection from AIEC infection by probiotic E. coli Nissle. *iScience*, 25(7). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104572>
- O'Brien, C. L., Bringer, M.-A., Holt, K. E., Gordon, D. M., Dubois, A. L., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., & Pavli, P. (2017). Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli. *Gut*, 66(8), 1382-1389. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311059>
- O'Brien, C., Pavli, P., Gordon, D., Holt, K., Dubois, A., Darfeuille-Michaud, A., & Bringer, M.-A. (2015). Comparative genome analysis of Crohn's Disease-associated adherent, invasive Escherichia coli fails to detect a common molecular property. *Journal of Crohn's and Colitis*, 9, S74-S75.
- Ormsby, M. J., Johnson, S. A., Carpena, N., Meikle, L. M., Goldstone, R. J., McIntosh, A., Wessel, H. M., Hulme, H. E., McConnachie, C. C., Connolly, J. P. R., Roe, A. J., Hasson, C., Boyd, J., Fitzgerald, E., Gerasimidis, K., Morrison, D., Hold, G. L., Hansen, R., Walker, D., ... Wall, D. M. (2020). Propionic Acid Promotes the

- Virulent Phenotype of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Cell Reports*, 30(7), 2297-2305.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.078>
- Ortiz, A., & Burdiles, P. (2010). Consentimiento informado. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(4), 644-652. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70582-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70582-4)
- Pace, F., Rudolph, S. E., Chen, Y., Bao, B., Kaplan, D. L., & Watnick, P. I. (2021). The Short-Chain Fatty Acids Propionate and Butyrate Augment Adherent-Invasive Escherichia coli Virulence but Repress Inflammation in a Human Intestinal Enteroid Model of Infection. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e0136921. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01369-21>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J.-F. (2018). Adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease. *Gut*, 67(3), 574-587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Párraga, I., & Martín, R. (2019). Importancia de los Comités de Ética en la Investigación en Medicina de Familia. *Atención Primaria*, 51(5), 263-265. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2019.04.001>
- Pathogenic Escherichia coli Strains Biological Agent Reference Sheets (BARS) | Environment, Health and Safety. (s.d.). Recuperat 15 juny 2024, de <https://ehs.cornell.edu/research-safety/biosafety-biosecurity/biological-safety-manuals-and-other-documents/bars-other/pathogenic-escherichia-coli>
- Pobeguts, O. V., Ladygina, V. G., Evsyutina, D. V., Ereemeev, A. V., Zubov, A. I., Matyushkina, D. S., Scherbakov, P. L., Rakitina, D. V., & Fisunov, G. Y. (2020). Propionate Induces Virulent Properties of Crohn's Disease-Associated Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.01460>
- Raso, T., Crivellaro, S., Chirillo, M. G., Pais, P., Gaia, E., & Savoia, D. (2011). Analysis of Escherichia coli Isolated from Patients Affected by Crohn's Disease. *Current Microbiology*, 63(2), 131-137. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9947-8>
- Rolhion, N., Carvalho, F. A., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). OmpC and the σE regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated Escherichia coli strain LF82. *Molecular Microbiology*, 63(6), 1684-1700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05638.x>
- Saitz, W., Montero, D. A., Pardo, M., Araya, D., De la Fuente, M., Hermoso, M. A., Farfán, M. J., Ginard, D., Rosselló-Móra, R., Rasko, D. A., Del Canto, F., & Vidal, R. M. (2022). Characterization of Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC) Outer Membrane Proteins Provides Potential Molecular Markers to Screen Putative AIEC Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9005. <https://doi.org/10.3390/ijms23169005>
- Sarem, F., Sarem-Damerdj, L. O., & Nicolas, J. P. (1996). Comparison of the adherence of three Lactobacillus strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines. *Letters in Applied Microbiology*, 22(6), 439-442. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1996.tb01198.x>
- Schoepfer, A. M., Dehlavi, M.-A., Fournier, N., Safroneeva, E., Straumann, A., Pittet, V., Peyrin-Biroulet, L., Michetti, P., Rogler, G., Vavricka, S. R., & Group, on behalf of the S. I. C. S. (2013). Diagnostic Delay in Crohn's Disease Is Associated With a Complicated Disease Course and Increased Operation Rate. *Official Journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 108(11), 1744. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.248>
- Sempere, L., Bernabeu, P., Cameo, J., Gutiérrez, A., García, M. G., García, M. F., Aguas, M., Belén, O., Zapater, P., Jover, R., Van-Der Hofstadt, C., & Ruiz-Cantero, M. T. (2023). Gender Biases and Diagnostic Delay in Inflammatory Bowel Disease: Multicenter Observational Study. *Inflammatory Bowel Diseases*, 29(12), 1886-1894. <https://doi.org/10.1093/ibd/izad001>
- Sevrin, G., Massier, S., Chassaing, B., Agus, A., Delmas, J., Denizot, J., Billard, E., & Barnich, N. (2020). Adaptation of adherent-invasive E. coli to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes*, 11(3), 364-380. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1421886>
- Simpson, K. W., Dogan, B., Rishniw, M., Goldstein, R. E., Klaessig, S., McDonough, P. L., German, A. J., Yates, R. M., Russell, D. G., Johnson, S. E., Berg, D. E., Harel, J., Bruant, G., McDonough, S. P., & Schukken, Y. H. (2006). Adherent and Invasive Escherichia coli Is Associated with Granulomatous Colitis in Boxer Dogs. *Infection and Immunity*, 74(8), 4778-4792. <https://doi.org/10.1128/iai.00067-06>
- Sinnecker, H., Ramaker, K., & Frey, A. (2014). Coating with luminal gut-constituents alters adherence of nanoparticles to intestinal epithelial cells. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5(1), 2308-2315. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.239>
- Smit, B., Chinaka, C. C., Scott, A. A., Gaiduschek, K., Hatje, E., Kuballa, A., Coulson, S., Finlayson, W., & Katouli, M. (2022). Efficacy of Selected Live Biotherapeutic Candidates to Inhibit the Interaction of an Adhesive-

- Invasive Escherichia coli Strain with Caco-2, HT29-MTX Cells and Their Co-Culture. *Biomedicines*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092245>
- Tanaka, R., Imai, J., Sugiyama, E., Tsubaki, S., Hozumi, K., & Tsugawa, H. (2024). Cyclic-di-AMP confers an invasive phenotype on Escherichia coli through elongation of flagellin filaments. *Gut Pathogens*, 16(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13099-024-00600-4>
- Tanaka, R., Imai, J., Tsugawa, H., Eap, K. B., Yazawa, M., Kaneko, M., Ohno, M., Sugihara, K., Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Barnich, N., Matsushima, M., Suzuki, T., Kagawa, T., Nishizaki, Y., Suzuki, H., Kamada, N., & Hozumi, K. (2023). Adherent-invasive E. coli – induced specific IgA limits pathobiont localization to the epithelial niche in the gut. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1031997>
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080), 1741-1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Vazeille, E., Bringer, M.-A., Gardarin, A., Chambon, C., Becker-Paully, C., Pender, S. L. F., Jakob, C., Müller, S., Lottaz, D., & Darfeuille-Michaud, A. (2011). Role of Meprins to Protect Ileal Mucosa of Crohn's Disease Patients from Colonization by Adherent-Invasive E. coli. *PLOS ONE*, 6(6), e21199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021199>
- Vazeille, E., Chassaing, B., Buisson, A., Dubois, A., de Vallée, A., Billard, E., Neut, C., Bommelaer, G., Colombel, J.-F., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., & Bringer, M.-A. (2016). GipA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated Escherichia Coli. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(1), 68-81. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000609>
- Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P. E., Maue, A. C., Dauriat, C. J. G., Barnich, N., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. (2020). Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive E. coli Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Reports*, 33(1), 108229. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108229>
- Wen, W., Xu, Y., Qian, W., Huang, L., Gong, J., Li, Y., Zhu, W., & Guo, Z. (2023). PUFAs add fuel to Crohn's disease-associated AIEC-induced enteritis by exacerbating intestinal epithelial lipid peroxidation. *Gut Microbes*, 15(2), 2265578. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2265578>
- Willing, B., Halfvarson, J., Dicksved, J., Rosenquist, M., Järnerot, G., Engstrand, L., Tysk, C., & Jansson, J. K. (2009). Twin Studies Reveal Specific Imbalances in the Mucosaassociated Microbiota of Patients with Ileal Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(5), 653-660. <https://doi.org/10.1002/ibd.20783>
- World Health Organization. (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio* (3a ed.) Organización Mundial de la Salud (OMS). <https://iris.who.int/handle/10665/43255>
- Zhang, D., Verstrepen, L., De Medts, J., Duysburgh, C., Van den Abbeele, P., Marzorati, M., & Khoo, C. (2021). A Cranberry Concentrate Decreases Adhesion and Invasion of Escherichia coli (AIEC) LF82 In Vitro. *Pathogens*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091217>
- Zwicker, J. I., Proffitt, R. T., & Reynolds, C. P. (1996). A microcomputer program for calculating cell population doubling time in vitro and in vivo. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 37(3), 203-210. <https://doi.org/10.1007/BF00688318>