

A scanning electron micrograph (SEM) of E. coli cells. The cells are rod-shaped and covered in fine, hair-like structures. Several long, thin, red flagella are visible, extending from the cells. The background is a light, textured surface.

TÉ L'ESCHERICHIA COLI UN PAPER EN LA CELIAQUIA?

Un estudi experimental de les seves
característiques d'adherència i invasió.

*2n de Batxillerat Científic
IES Santa Coloma de Farners
Curs 2012-2013*

Índex

Índex	1
Introducció	2
1. La flora intestinal	3
1.1. Què és la flora intestinal?	3
1.2. De què depèn la flora intestinal?	3
1.3. Com sol ser la flora normal?	4
1.4. Alteracions en la flora normal	4
1.4. Alteracions en la flora normal: disbiosi.....	4
2. La immunitat.....	5
2.1. La immunitat.....	5
2.2. El procés inflamatori.....	5
3. Les malalties digestives.....	6
3.1. Les malalties inflamatòries intestinals.....	6
3.1.1. Diferències entre la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa	7
3.2. La celiaquia.....	7
4. Escherichia coli.....	9
4.1. Qui és l'Escherichia coli.....	9
4.2. Varietats patògenes d'Escherichia coli.....	9
5. AIEC, un patotipus d'Escherichia coli recentment descrit	11
5.1. L'Escherichia coli en la malaltia de Crohn.....	11
5.2. L'AIEC en altres malalties intestinals diferents a la MC	13
6. Treball experimental.....	14
6.1. Antecedents i objectius.....	14
6.2. Material i mètodes.....	15
6.2.1 Preparació dels cultius cel·lulars i bacterians.....	15
6.2.2. Tasques prèvies als assajos d'identificació del patovar AIEC.....	16
6.2.3. Identificació del patovar AIEC.....	16
6.3. Resultats	19
6.4. Interpretació dels resultats i conclusions.....	21
7. Conclusions.....	23
Agraïments.....	25
Bibliografia i webgrafia.....	26
Glossari.....	28
Annex-1.....	29
Annex-2.....	35
Annex-3.....	45

Foto portada:

http://www.gizmodo.fr/wp-content/uploads/2011/10/Fotolia_32769654_Subscription_XXL.jpg

Introducció

Tot i tenir bastant clar que volia fer un treball sobre biologia, no em va ser gens fàcil decantar-me per un tema. Després de molt buscar, em vaig assabentar que hi havia un equip d'investigació de la Universitat de Girona que estava treballant amb bacteris i que ells em podrien tutoritzar el treball. Vaig parlar concretament amb la doctora Margarita Martínez, qui em va explicar el projecte científic que estaven duent a terme, i em va semblar que realitzar alguns dels experiments previstos podria ser un bon treball. Així em podria endinsar més en com treballen els microbiòlegs al laboratori.

Vaig demanar la Beca Botet i Sisó i el Jove Campus de Recerca, tots dos ajuts de la UdG per al desenvolupament del Treball de Recerca, i me'ls van concedir. Em van anar molt bé perquè gràcies a això vaig poder anar durant tot el mes de juliol al laboratori a fer la part experimental del meu treball i mantenir més contacte amb la Margarita, que m'ha estat guiant.

Un dels objectius d'aquest treball era la familiarització amb la microbiologia al laboratori, preparant cultius cel·lulars i bacterians i manipulant-los. Per a mi, tot això era molt nou, i vaig haver de buscar molta informació prèvia per entendre conceptes que després utilitzaria molt al llarg del treball, tant conceptes biològics i relacionats amb les malalties o bacteris com de material i productes utilitzats al laboratori.

D'altra banda, en la meua recerca pretenia aprendre sobre la flora intestinal i com influeixen els bacteris que en formen part en el desenvolupament de malalties de l'aparell digestiu. Per aquesta raó, tracto especialment la comparació de mostres l'*Escherichia coli* entre malalts de Crohn i celíacs. L'equip de la UdG treballa sobretot amb la malalta de Crohn, i amb estudis com aquest vol arribar a veure si un tipus d'*E. coli* descrit recentment és només present en malalts de Crohn o si també hi és en d'altres malalties intestinals, com ara la celiaquia, la colitis ulcerosa o el càncer colorectal. A partir dels resultats obtinguts es podria determinar si aquesta soca bacteriana està només relacionada amb aquesta malaltia per saber si forma més part de la causa o la conseqüència de la malaltia, i així ajudar en el tractament del Crohn al qual, de moment, no s'hi ha trobat cura.

1. La flora intestinal

1.1. Què és la flora intestinal?

La flora intestinal humana és un ecosistema complex integrat per milions de bacteris que es troben al lumen i a la mucosa que recobreix la paret de les cèl·lules epitelials intestinals (Figura 1). Aquest conjunt de microorganismes s'anomenen **microflora** o **microbiota intestinal**, i viuen en una relació de *simbiosi** tant de tipus *comensal** com de *mutualisme** amb nosaltres, i sense la major part d'ells no podríem viure.

La gran majoria d'aquests bacteris no són perjudicials per a la nostra salut, i molts ens són beneficiosos. Els

principals beneficis que el nostre organisme n'obté són:

- Degradació de compostos dels aliments que el nostre sistema digestiu no pot degradar
- Ajut en l'absorció de nutrients
- Eliminació de compostos perjudicials per a nosaltres
- Síntesi de determinats compostos, com la vitamina K i algunes del complex B
- Col·laboren amb el sistema immunitari per fer front a patògens

1.2. De què depèn la flora intestinal?

La flora intestinal, que es regenera periòdicament excretant els microorganismes a través de la femta, està influenciada per una sèrie de factors intrínsecs (secrecions intestinals) i extrínsecs. Aquests darrers poden ser l'envelliment, la dieta, l'estrès, els antibiòtics (que actuen en contra de la flora) i la ingesta d'aliments o suplementos alimentaris amb organismes probiòtics (bacteris seleccionats que ens són beneficiosos) o amb components prebiòtics (que afavoreixen el desenvolupament de la flora desitjable).

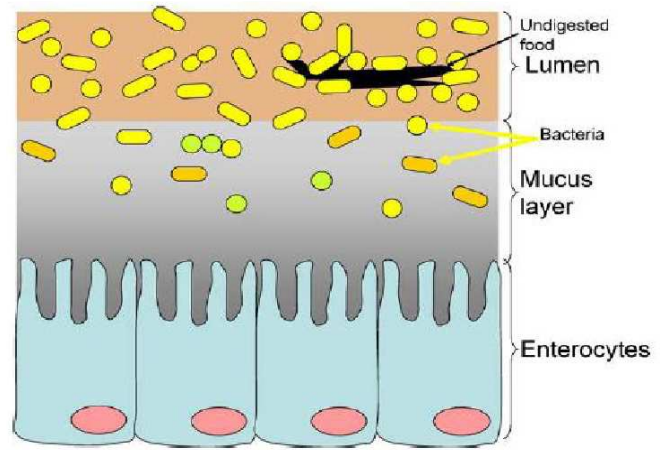


Figura 1. Esquema de les cèl·lules epitelials, amb la capa mucosa i el lumen (espai interior del tub intestinal), menjar sense digerir i bacteris.

Font:

<http://htmlimg2.scribdassets.com/8014kxsf8pc38v/image/s/10-71545be0e3.jpg>

1.3. Com sol ser la flora normal?

En la flora normal d'un humà hi ha més de 500 espècies bacterianes diferents, tot i que el 99% del total de la comunitat es compon de només 30-40 espècies (Figura 2).

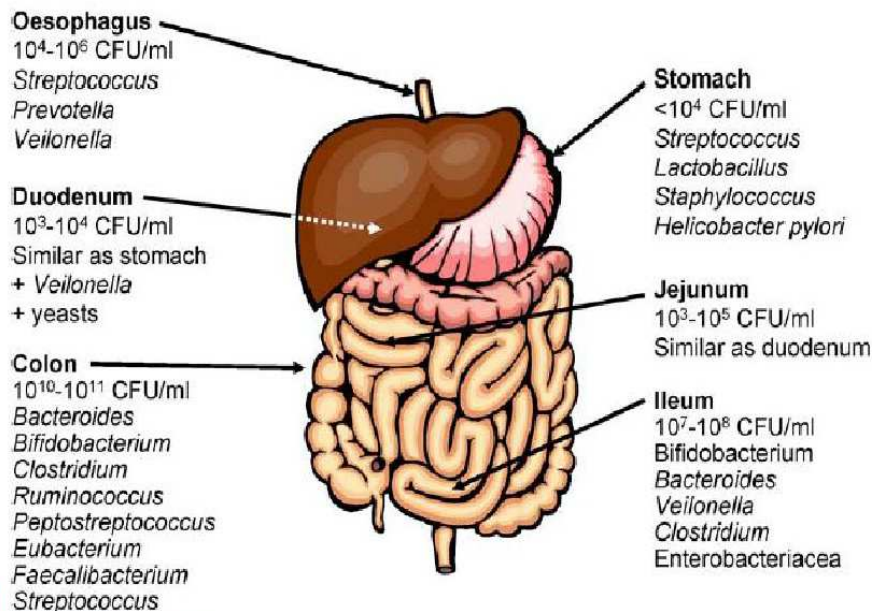


Figura 2. Espècies bacterianes més abundants a les diferents parts del tracte gastrointestinal humà.
Font: <http://htmlimg3.scribdassets.com/80l4kxsf8pc38v/images/44-2096d452b1.jpg>

1.4. Alteracions en la flora normal: disbiosi

El conjunt d'alteracions en la microbiota intestinal s'anomena **disbiosi**, i s'ha relacionat amb malalties inflamatòries de l'intestí i amb altres trastorns relacionats amb el sistema immunològic, ja que han disminuït els bacteris protectors (com ara *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*), i han augmentat els nocius (com *Bacteroides* i algunes soques* d'*Escherichia coli*). Aquesta qualitat d'alguns bacteris de ser nocius també s'anomena *patogènes**, i ve regulada pels seus **gens de virulència***, transferibles entre diferents individus, de manera que un bacteri no *patogen** es pot convertir en un de patogen.

2. La immunitat

2.1. La immunitat

Els teixits humans, excepte l'interior de les cavitats dels aparells digestiu, respiratori i reproductor, són pràcticament estèrils. Per a fer front a organismes patògens que ens puguin causar algun tipus de malaltia, tenim diferents defenses a l'organisme. Externament, trobem els epitelis, les mucoses i la flora bacteriana. Si algun patògen ha aconseguit travessar aquestes barreres, se'n troba unes d'interne que són els vasos, òrgans i teixits limfàtics i les cèl·lules i molècules del torrent sanguini. Aquí poden actuar defenses específiques per a cada tipus de patògen, com els anticossos, o inespecífiques, com quan es produeix el procés d'inflamació.

La **immunitat** és la capacitat de resistir a un agent infecció, sigui per la defensa que realitza el sistema immune o per la barrera que defensa l'organisme de la infecció.

2.2. El procés inflamatori

Quan la pell o mucoses pateixen una lesió, es produeix envermelliment (per l'augment de flux sanguini de la zona), inflamació (el volum de la zona també augmenta per l'augment de flux sanguini), dolor (perquè fa pressió sobre les terminacions nervioses) i febre locals (perquè la temperatura elevada activa el metabolisme dels macròfags i inhibeix la divisió bacteriana).

Un cop s'ha detectat la infecció, són atretes cap a la zona diferents tipus de cèl·lules immunològiques. Un exemple en són els **neutròfils**, els qui principalment realitzen la fagocitosi, és a dir, englobar per destruir o digerir elements, en aquest cas, els infecciosos, com els bacteris (Figura 3).

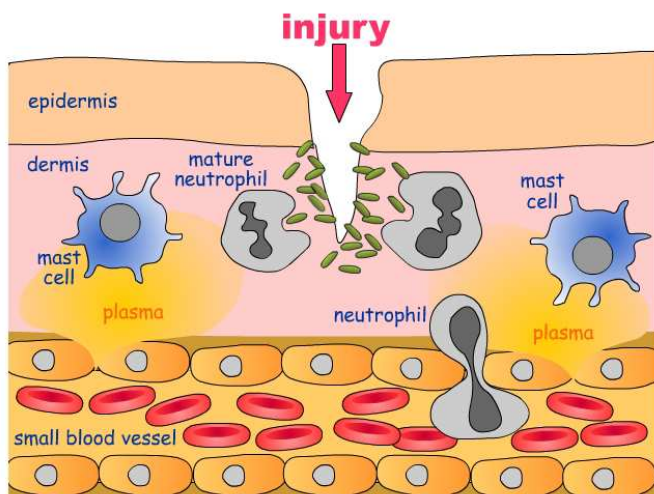


Figura 3. Mecanisme de la inflamació, en què s'aprecia la infecció a la dermis amb la reacció de l'organisme augmentant el flux sanguini o activant els neutròfils, per exemple.

Font:
<http://www.hcc.bcu.ac.uk/physiology/inflammation.jpg>

3. Les malalties digestives

Existeixen moltes malalties digestives diferents, és a dir, que afectin alguna zona de l'aparell digestiu, però només en tractaré algunes perquè són les que tenen una relació directa amb l'objectiu del treball, és a dir, la malaltia de Crohn (explicada juntament amb la colitis ulcerosa perquè hi està molt relacionada) i la cèliaquia.

3.1. Les malalties inflamatòries intestinals

Les **Malalties Inflamatòries Intestinals (MII)** són desordres intestinals inflamatoris crònics d'etiologia desconeguda, és a dir, de les quals no se'n coneix l'origen. Es diferencien principalment entre la **malaltia de Crohn (MC)** i la **colitis ulcerosa**, que presenten moltes similituds (Figures 4 i 5).



Figura 4. Interior del tub digestiu d'un pacient amb malaltia de Crohn.

Font: http://www.medicasalud.com/images/iliitendoskopie_480.jpg

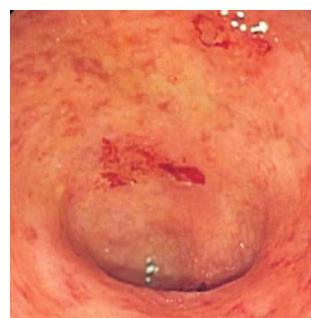


Figura 5. Interior del tub digestiu d'un pacient amb Colitis Ulcerosa.

Font: <http://m1.paperblog.com/i/154/1541923/bacterias-modificadas-geneticamente-podrian-a-L-VKWS4Q.png>

Es desconeixen les causes de l'aparició d'aquestes malalties, però sí que s'han trobat factors que hi influeixen molt: la predisposició genètica i sistema immunològic, que fan que l'hoste hi sigui més susceptible, o factors externs i ambientals, com l'estil de vida i els microorganismes. Referent a això, està demostrat que els pacients amb malaltia de Crohn presenten disbiosi, ja que la composició microbiana de la flora intestinal està desequilibrada i hi ha un descens en la població de bacteris protectors i un increment en microorganismes que promouen la inflamació. Diversos estudis han confirmat, a més, que la població que ha augmentat més és la d'*Escherichia coli*, i altres estudis, que s'estan duent a terme actualment, pretenen descobrir quin paper hi tenen en aquestes malalties.

L'inici d'una MII sol ser entre els 15 i 30 anys, però pot començar a qualsevol edat. Aquestes malalties afecten entre 10 i 12 habitants per cada 100.000, en igual proporció d'homes i dones. Ens els darrers anys el nombre d'afectats ha crescut molt i malgrat que hi ha tractaments que ajuden a controlar-ne els símptomes i evitar nous brots, no es coneix cap cura farmacèutica per les malalties, tot i que es pot recórrer a la cirurgia.

Els **símptomes** poden ser variats, però en termes generals són: dolor abdominal, diarrea (sovint amb sang), vòmits o pèrdua de pes, a part de complicacions fora del tracte gastrointestinal, com erupcions cutànies, artritis, inflamacions oculars, fatiga, manca de concentració, i poden arribar a causar la mort (tot i que no és gaire freqüent). Les malalties són cròniques i evolucionen per brots, amb períodes llargs sense símptomes o pocs, i èpoques d'agudització, i les condicions milloren gràcies al tractament.

3.1.1. Diferències entre la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa

La principal diferència entre les MII és la seva zona d'afectació en el tracte gastrointestinal. Mentre que la **malaltia de Crohn** pot afectar qualsevol part del tracte (des de la boca fins a l'anús, essent l'ili terminal la zona més freqüentment afectada), formant úlceres profundes de forma discontinua, la colitis ulcerosa només afecta a l'intestí gros, formant moltes úlceres més petites que sagnen però de forma contínua. Per això, el tractament d'aquestes malalties és diferenciat, ja que mentre en la colitis ulcerosa n'hi ha prou en extirpar l'intestí gros, en el Crohn no serviria perquè podria aparèixer en un altre lloc.

3.2. La celiàquia

La celiàquia és una malaltia autoimmunitària, caracteritzada per una pèrdua total o parcial de les vellositats que recobreixen l'intestí prim i desencadenada per la ingestió de proteïnes de gluten de cereals.

Es produeix en persones amb predisposició genètica de totes les edats.

Els símptomes inclouen diarrea crònica, retard del creixement (en nens), i el cansament, però aquests poden estar absents, i s'han descrit símptomes en els altres òrgans.

Aquest trastorn està associat amb desequilibris en la composició de la microbiota intestinal.

La malaltia celíaca és causada per una reacció immunològica contra la proteïna gluten, present en el blat, i d'altres proteïnes similars presents en varietats com l'ordi i el sègol.

Quan aquestes proteïnes es posen en contacte amb uns enzims determinats, se'ls modifica l'estructura. Aquesta nova estructura provoca una reacció inflamatòria per part del sistema immunològic que trenca les vellositats que recobreixen l'intestí prim. Com que aquestes vellositats són les responsables de l'absorció de nutrients, aquesta inflamació influeix en aquesta absorció.

L'únic tractament eficaç que es coneix és una dieta lliure de gluten durant tota la vida, que permet no tornar a experimentar més els símptomes de la malaltia.

Tot i que la malaltia és causada per una reacció a les proteïnes de blat, no és el mateix que l'al·lèrgia al blat, ja que no fa només una reacció de resposta inflamatòria, sinó que destrueix els propis teixits.

4. *Escherichia coli*

4.1. Qui és l'*Escherichia coli*

L'*Escherichia coli* (sovint abreujada *E. coli*) és una espècie bacteriana que viu a la mucosa de l'intestí dels animals de sang calenta, com els ocells i els mamífers, i és imprescindible per la digestió dels aliments (Figures 6 i 7).

Actualment és l'ésser viu sobre qui se'n té més coneixement biomolecular, ja que és fàcilment manipulable al laboratori.

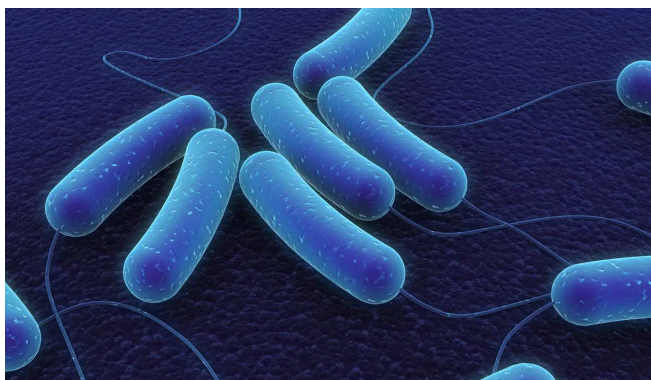


Figura 6. Diversos individus d'*E. coli* amb flagells.
Font: http://www.haccpeuropa.com/wp-content/uploads/2012/01/E_Coli_Bacteria.jpg

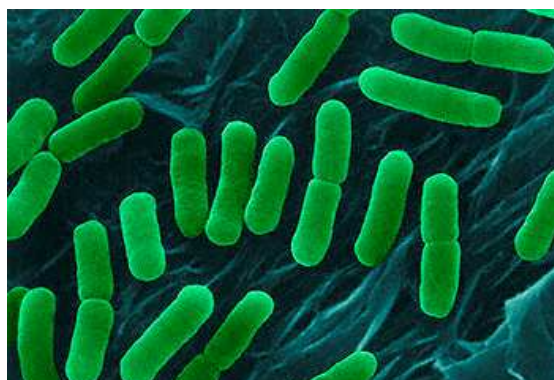


Figura 7. Diversos individus d'*E. coli*.
Font: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/moder_just/Images/96444A.jpg

4.2. Varietats patògenes d'*Escherichia coli*

La major part de soques d'aquest bacteri no són patògenes, sinó que viuen a l'intestí de l'home i la resta de mamífers formant part de la flora intestinal normal, amb una relació de simbiosi i sense causar cap malaltia.

La resta de soques, que són minoria, han desenvolupat la capacitat de causar una àmplia gamma de malalties humanes. Cal tenir en compte que en pacients immunodeprimits o quan la barrera gastrointestinal es trenca, fins i tot soques no patògenes d'*E. coli* poden causar infecció. Els patògens d'*E. coli* comparteixen amb molts altres patògens de les mucoses una progressió de la patogènesi que consisteix en la colonització d'un lloc de la mucosa, l'evasió de les defenses de l'hoste, la multiplicació i, finalment, el dany a l'hoste. Les *E. coli* patògenes es classifiquen en dos grans grups depenent dels gens de virulència que tinguin i, per tant, del tipus d'infecció que causen:

***E. coli* patògena extraintestinal (ExPEC)** → causa infeccions fora del tracte digestiu, com infeccions al tracte urinari (UPEC), sèpsia i meningitis (MNEC).

***E. coli* diarrogènica** (DEC) → també s'anomena entèrica, ja que causa infeccions intestinals. N'existeixen sis *patotipus** ben descrits:

- *E. coli enteropatogènica* (EPEC), que afecta les microvellositats de l'intestí prim.
- *E. coli enterohemorràgica* (EHEC), que produeix toxines que causen gastroenteritis hemorràgica.
- *E. coli enterotoxigènica* (ETEC), que provoca diarrea aquosa degut a la producció de toxines (Figura 8).
- *E. coli enteroagregativa* (EAEC), que forma agregats a la superfície de la mucosa intestinal i també provoca diarrea persistent.
- *E. coli enteroinvasiva* (EIEC), que penetra a les cèl·lules de l'epiteli intestinal, causant de febre, rampes abdominals i diarrea amb sang i moc.
- *E. coli d'adherència difusa* (DAEC), tenen una difusa característica d'adherència a les cèl·lules intestinals i també causen diarrea.

S'han descrit també altres patotipus diferents d'*E. coli*, però encara no han estat gaire estudiats, com per exemple l'*E. coli adherent i invasiu* (AIEC), que es tractarà en l'apartat següent.



Figura 8. Patotip ETEC, que presenta fimbries per a adherir-se a superfícies.

Font: 147 Nature © Macmillan Magazines Ltd (1992).

5. AIEC, un patotipus d'*Escherichia coli* recentment descrit

5.1. L'*Escherichia coli* en la malaltia de Crohn

Comparant la flora intestinal de pacients amb malaltia de Crohn (MC) amb controls (persones sanes), s'ha observat que en els de MC hi havia més quantitat d'*E. coli*. Llavors, un dels tipus d'*E. coli* més abundants en la MC s'ha anomenat *E. coli adherent-invasiva*, després d'haver-lo estudiat segons:

- Característiques **genotípiques** → s'han estudiat els seus **gens de virulència** i s'ha vist que eren semblants als de les *E. coli* extraintestinals i a les comensals.
- Característiques **fenotípiques** → s'ha vist que aquestes *E. coli* tenen les capacitats de: **adhesió** i **invasió** de les cèl·lules intestinals (gràcies a unes estructures anomenades fímbries o pilis), i la supervivència i **replicació** dins de macròfags sense provocar la mort cel·lular de l'hoste (fet que indica que podrien estar involucrades en l'estimulació d'antígens crònics, l'activació de cèl·lules T i macròfags i en la formació de granulomes) (Figures 9 i 10).

Aquesta varietat patògena anomenada AIEC (de l'anglès adherent-invasive *E. coli*, és a dir *E. coli* adherent-invasiva) es caracteritza per les capacitats d'adhesió i invasió de les cèl·lules intestinals i la supervivència i replicació dins de macròfags.

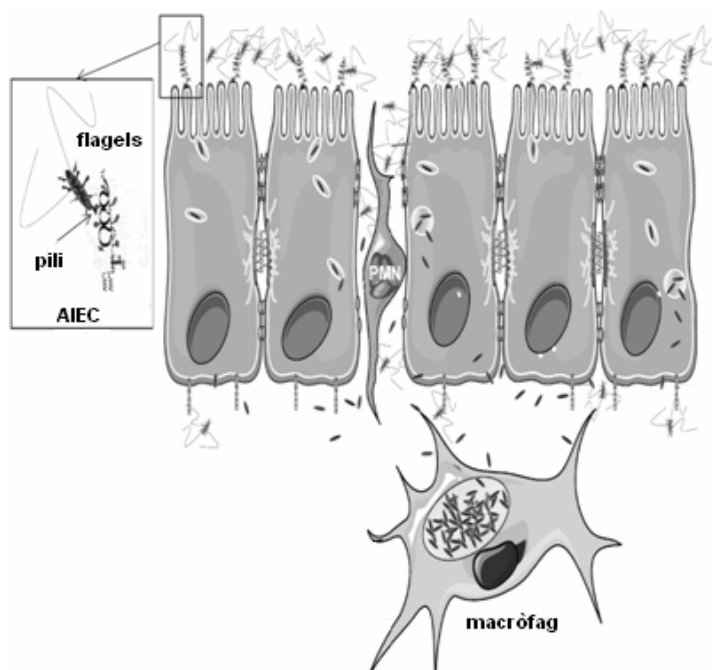


Figura 9. Esquema del mecanisme patològic de l'AIEC on s'aprecien les capacitats d'adhesió i invasió a les cèl·lules epitelials i de supervivència i replicació dins de macròfags.
Font: Glasser & Darfeuille-Michaud (2008).



Figura 10. Cèl·lules de l'epiteli intestinal infectades amb AIEC (esquerra) i amb un altre bacteri no adherent-invasiu.

Font: Garcia-Gil, L. J., (2012)

Malgrat l'existència d'una gran diversitat de soques dins el *patovar** AIEC, encara no se'n coneix cap gen de virulència específic, fet que dificulta molt la seva identificació i caracterització. Actualment, la única manera d'identificar-lo és mitjançant l'anàlisi fenotípic de les capacitats d'adhesió i invasió de les cèl·lules intestinals i l'habilitat per a sobreviure i replicar-se dins de macròfags.

S'ha comprovat que aquest patovar pot ésser present tant en pacients amb MC, (especialment en malalts amb afectació ileal) com en els controls, però es troba més freqüentment en els malalts de Crohn (prevalença del 50% i 16% respectivament).

Es creu que el patotip AIEC està implicat d'alguna manera en la MC, formant més part de la causa que no pas de la conseqüència de la inflamació, degut a que les característiques fenotípiques del patotip estan relacionades en diversos aspectes de la patogènesi de la MC, com per exemple:

- La capacitat de les AIEC d'adhesió i invasió de les cèl·lules de l'epiteli intestinal induïx la resposta inflamatòria. D'aquesta manera, com que les cèl·lules del nostre cos es veuen invadides, es produeix una inflamació per a defensar-se.
- Les AIEC són capaces de reduir la funció de barrera de l'epiteli intestinal, reduint l'expressió de les proteïnes d'unió estreta (proteïnes que uneixen les cèl·lules creant una barrera de permeabilitat impeding el flux lliure de substàncies entre cèl·lules), la qual cosa condueix a una permeabilitat intestinal alterada.
- Les AIEC formen granulomes *in vitro*, característica típica de la malaltia de Crohn.

Tot i això, però, la seva descoberta en persones sanes suggereix que l'AIEC és un *patogen facultatiu**, és a dir, que pot causar malaltia en hostes susceptibles i que, a més, és només un dels molts factors que poden estar implicats en la MC, com ho són també el menjar no saludable, prendre antibiòtics o fumar.

5.2. L'AIEC en altres malalties intestinals diferents a la MC

A part de la seva presència en la MC, també es vol estudiar en altres malalties intestinals, com ara:

- **Càncer colorectal** → alguns estudis han detectat AIEC en la mucosa intestinal de pacients amb càncer colorectal. Per això, es proposa que aquest càncer pot ser el resultat d'una inflamació lleu continuada i d'un error en l'*apoptosi** causat per la presència d'aquests bacteris intracel·lulars. Tot i això, es necessiten altres estudis independents que determinin la prevalença de l'AIEC en la mucosa de pacients amb càncer colorectal per a corroborar o desestimar la implicació de l'AIEC en aquesta malaltia.
- **Colitis ulcerosa** → la prevalença d'AIEC en aquesta malaltia encara no es coneix, ja que hi ha resultats discordants entre laboratoris.
- **Celíaquia** → encara no s'ha investigat la presència d'AIEC en pacients amb celíaquia, però s'han aïllat soques d'*E. coli* de celíacs que són portadores de gens de virulència característics de soques de malalties extraintestinals, situació similar a la dels pacients amb MC i poc freqüent en individus control (sans).

6. Treball experimental

6.1. Antecedents i objectius

La part experimental que he realitzat al laboratori forma part d'un projecte que està duent a terme el Grup de Microbiologia Clínica i Malalties Infeccioses de la Universitat de Girona juntament amb el Departament de Gastroenterologia de l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona i l'Àrea de Digestologia de l'Hospital Santa Caterina de Salt. Aquest projecte pretén estudiar: (1) la distribució del patovar adherent-invasiu d'*Escherichia coli* (AIEC) en malalties intestinals diferents de la malaltia de Crohn, (2) la seva similitud amb soques patògenes animals i (3) determinar els gens implicats en el fenotip que descriu aquest patovar, per a comprendre el mecanisme de patogènesi d'aquest patovar i per a poder-se fer servir per a la seva detecció ràpida en individus.

Fins ara, l'AIEC ha estat poc analitzat. Estudis recents l'han implicat en la causa de la malaltia de Crohn, però fins ara són pocs els treballs que han estudiat les poblacions d'*E. coli* en altres malalties intestinals, com ara la colitis ulcerosa, la celiaquia i el càncer colorectal. Per això, en el meu treball em centro exclusivament en l'objectiu (1) del paràgraf anterior, i tractant només la malaltia celíaca, és a dir, que l'**objectiu** principal de la meva recerca ha estat donar resposta a la següent pregunta:

Està associat el patovar AIEC a la celiaquia?

Tot seguit em vaig plantejar la següent **hipòtesi**:

Com que les *E. coli* dels pacients amb celiaquia s'assemblen genèticament al patotipus AIEC associat a la malaltia de Crohn es preveu que l'AIEC podria estar també present a l'intestí dels malalts de celiaquia.

D'altra banda, determinar la prevalença del patovar AIEC en les altres malalties intestinals ajudarà a esbrinar quina és la participació d'aquest patovar a la MC. En la meva recerca no s'aprofundeix en aquest tema, però és també molt important perquè si es detectés que en les altres malalties inflamatòries intestinals no hi és en quantitat, es podria descartar que fos una conseqüència de la MC, ja que en totes es produeixen uns efectes semblants, la inflamació. D'aquesta manera, s'aconseguiria millorar el tractament de la MC per la qual no s'hi ha trobat cura, de moment.

6.2. Material i mètodes

6.2.1 Preparació dels cultius cel·lulars i bacterians

Abans de dur a terme l'experiment de identificació del fenotip AIEC en les soques bacterianes de pacients celíacs vaig fer una sèrie de treballs al laboratori per tal de tenir-ho tot preparat per a l'experiment. Aquestes feines, resumides a continuació, es troben detallades a l'annex-2.

Les cèl·lules intestinals I-407 es cultiven en un flascó amb un medi adequat i nutrients en una incubadora a 37°C amb el 5% de CO₂. Les cèl·lules es desenvolupen en aquest medi i quan la confluència és del 80-85% (aproximadament cada dos o tres dies) es fa un subcultiu en un flascó nou, amb medi fresc. A partir d'aquests ja es podran agafar les cèl·lules corresponents per a fer la infecció.

D'altra banda, vam duplicar els glicerinars, que són cultius d'*Escherichia coli* en medi líquid LB als quals hem afegit glicerol per a mantenir els bacteris en vida a molt baixa temperatura mesos o anys, fins que s'hagin d'utilitzar per als experiments. A partir dels glicerinars que tenim a -80°C, n'hem fet una còpia per ser guardada a -20°C perquè si se'ns contaminen durant els assajos puguem recórrer als primers aïllats. Els passos que vam seguir són:

- 1- Per començar vam assegurar-nos que els aïllats que teníem congelats amb glicerol (glicerinars) eren *Escherichia coli*. Ho vam fer cultivant aquests aïllats en medi TBX amb agar, ja que és un medi selectiu en el qual només les colònies d'aquest bacteri queden de color verd-blau. Les que no quedaven d'aquest color o estaven contaminades les vam descartar de l'experiment.
- 2- Després vam preparar cultius en medi líquid LB per augmentar el nombre de bacteris que teníem, els anomenats cultius de nit.
- 3- Per dur a terme l'assaig d'invasió, es necessita que les soques que utilitzem no siguin resistents a l'antibiòtic gentamicina, ja que aquest assaig es basa en la utilització d'aquest antibiòtic per a matar tots els bacteris extracel·lulars i poder quantificar només els que han estat capaços d'envair les cèl·lules intestinals. Per això, prèviament s'havien de descartar els aïllats que eren sensibles a aquest antibiòtic. Ho vam fer inoculant els aïllats en medi líquid LB amb gentamicina a partir dels cultius de nit. Si els aïllats eren sensibles no creixien en el medi, quedant el medi translúcid, mentre que si eren resistents s'observava terbolesa, que indica creixement. Vam descartar de l'experiment els que eren resistents.
- 4- Finalment ja vam preparar la duplicació dels glicerinars barrejant cada soca del cultiu de nit amb glicerol, i els vam congelar.

6.2.2. Tasques prèvies als assajos d'identificació del patovar AIEC

Quan ja teníem els cultius cel·lulars renovats i els bacterians congelats, només va faltar preparar-los adequadament per utilitzar a l'experiment. Aquests passos, resumits a continuació, es troben detallats a l'annex-2.

D'una banda, vam preparar 2 plaques de 24 pouets (una per l'assaig d'adhesió i l'altra per al d'invasió) amb una densitat de $4 \cdot 10^5$ cèl·lules I-407 per pouet per deixar-les incubar amb 5% de CO₂ a 37°C durant 20 hores perquè s'enganxessin al flascó i obtenir així una monocapa sense que tinguin temps a dividir-se, fet que distorsionaria el resultat en augmentar el nombre de cèl·lules.

D'altra banda, vàrem inocular les soques bacterianes procedents dels glicerinars en medi LB pel cultiu de nit. Per a això, vam dipositar 1,5 ml d'LB líquid en cada tub de vidre estèril i 10µl de cada soca congelada en cada tub de vidre amb LB. Vam deixar aquest cultiu durant tota la nit a la incubadora a 37°C perquè proliferessin fins a acabar els nutrients del tub per a utilitzar aquests bacteris per a l'experiment el dia següent.

Finalment, vam preparar el medi LB amb agar i el vam emplacar, és a dir, dipositar-lo en les plaques de Petri on sembraríem els bacteris després de realitzar l'experiment perquè formin les colònies i poder-los quantificar.

6.2.3. Identificació del patovar AIEC

Per tal de confirmar si els aïllats d'*E. coli* provinents de celíacs presentaven un fenotip AIEC vam realitzar assaigs quantitius d'adherència i invasió de cèl·lules intestinals, capacitats característiques d'aquest patovar: si les *E. coli* que estudiava tenien aquestes capacitats, les considerariem AIEC i, si no les tenien, no.

Per a l'experiment vam utilitzar 22 aïllats diferents, ja que els 2 pouets restants eren pels controls positiu i negatiu (un sabem que és AIEC i per tant que ha de ser adherent i invasiu i l'altre que no és patogen i segurament no serà ser adherent i invasiu), i en les dues plaques havíem d'infectar els mateixos aïllats i en la mateixa concentració ja que una serviria per l'assaig d'adhesió i l'altra pel d'invasió.

Un cop preparats els cultius bacterians (cultiu de nit) i els pous amb les cèl·lules intestinals per a ser infectades ja es podia dur a terme l'experiment seguint el protocol següent:

1- Havíem d'infectar amb una MOI=10 (*multiplicity of infection*), que significa que per a cada cèl·lula intestinal s'hi inoculen 10 bacteris. A cada pouet hi havia $4 \cdot 10^5$ cèl·lules, per tant, hi vam posar $4 \cdot 10^6$ bacteris. Com que els cultius de nit dels diversos aïllats contenien un nombre diferent de bacteris, aquests s'havien de quantificar i posteriorment ajustar a la concentració desitjada. Per això vam quantificar l'absorbància de cada cultiu

utilitzant l'espectrofotòmetre. A partir d'aquest valor vam fer alguns càlculs (detallats a l'annex-1) per a saber quant s'havia de diluir cada cultiu de nit per a tenir els $4 \cdot 10^6$ bacteris necessaris en els 0,025 ml de cultiu bacterià que introduiríem a cada pouet.

2- Tot seguit vam agafar les dues plaques dels pouets amb cèl·lules, en vam buidar el medi, i hi vam fer 2 rentats amb PBS, una solució salina isotònica amb les cèl·lules (se n'afegeix amb una pipeta i es buida abocant-lo).

3- Amb una pipeta estèril i el pipetejador hi vam afegir 1 ml de medi EMEM amb FBS i vam dur a terme la infecció: afegir els 0,025 ml de bacteris amb la micropipeta i puntes de micropipeta estèrils.

4- Vam deixar incubar la infecció durant 3 h a 37°C amb un 5% de CO_2 . Passat aquest temps vam fer els assaigs d'adhesió i invasió per separat, que s'expliquen tot seguit (Figura 9).

a) Adhesió

5- Vam fer 4 rentats amb PBS per a treure les cèl·lules mortes i els bacteris no adherits i vam afegir una solució de Tritó X-100 per a trencar i disgregar les cèl·lules intestinals, la qual cosa permet alliberar els bacteris adherits i intracel·lulars per a la seva posterior sembra per recompte en placa. La sembra l'havíem de fer en menys de 30 minuts per evitar la lisi bacteriana (trencament de les cèl·lules bacterianes) per contacte amb el Tritó X-100.

6- Per a la quantificació, calia fer un banc de dilucions per tal d'aconseguir colònies aïllades i poder recomptar-les. Vam preparar els tubs de plàstic Eppendorf per a fer el banc de dilucions, a cadascun hi varem posar 450 μl de Ringer (solució salina) i 50 μl de la suspensió bacteriana dels pous. Per cada dilució vam afegir 50 μl de l'Eppendorf anterior als 450 μl de Ringer del tub que volem. Els càlculs del banc de dilucions es troben a l'annex-1. Segons el protocol, en l'assaig d'adhesió s'havien de preparar les dilucions de 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} .

7- Vam sembrar 25 μl de les dilucions corresponents en les plaques d'LB amb agar i deixar-ho incubar 24 hores perquè es formin les colònies. Tot seguit ja vam poder fer el recompte de de colònies i calcular la quantitat de bacteris al pou després de les 3 hores d'infecció.

b) Invasió

Els passos van ser els mateixos que amb l'assaig d'adhesió però abans d'afegir-hi el Tritó X-100 vam fer el següent: 2 rentats amb PBS en comptes de 4, afegir-hi la solució de gentamicina (EMEM amb 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina durant una hora per eliminar els bacteris extracel·lulars) i 2 rentats més amb PBS. En aquest cas, vam sembrar la

suspensió bacteriana directa (sense fer cap dilució, és a dir, 10^0) i les dilucions de 10^{-1} , 10^{-2} .

Vam realitzar aquest experiment diverses vegades per a obtenir triplicats de totes les soques per tal que el resultat sigui més acurat a partir de les mitjanes, repetint una quarta vegada algunes soques que havien donat un resultat inesperat, conseqüència d'algun error durant procediment.

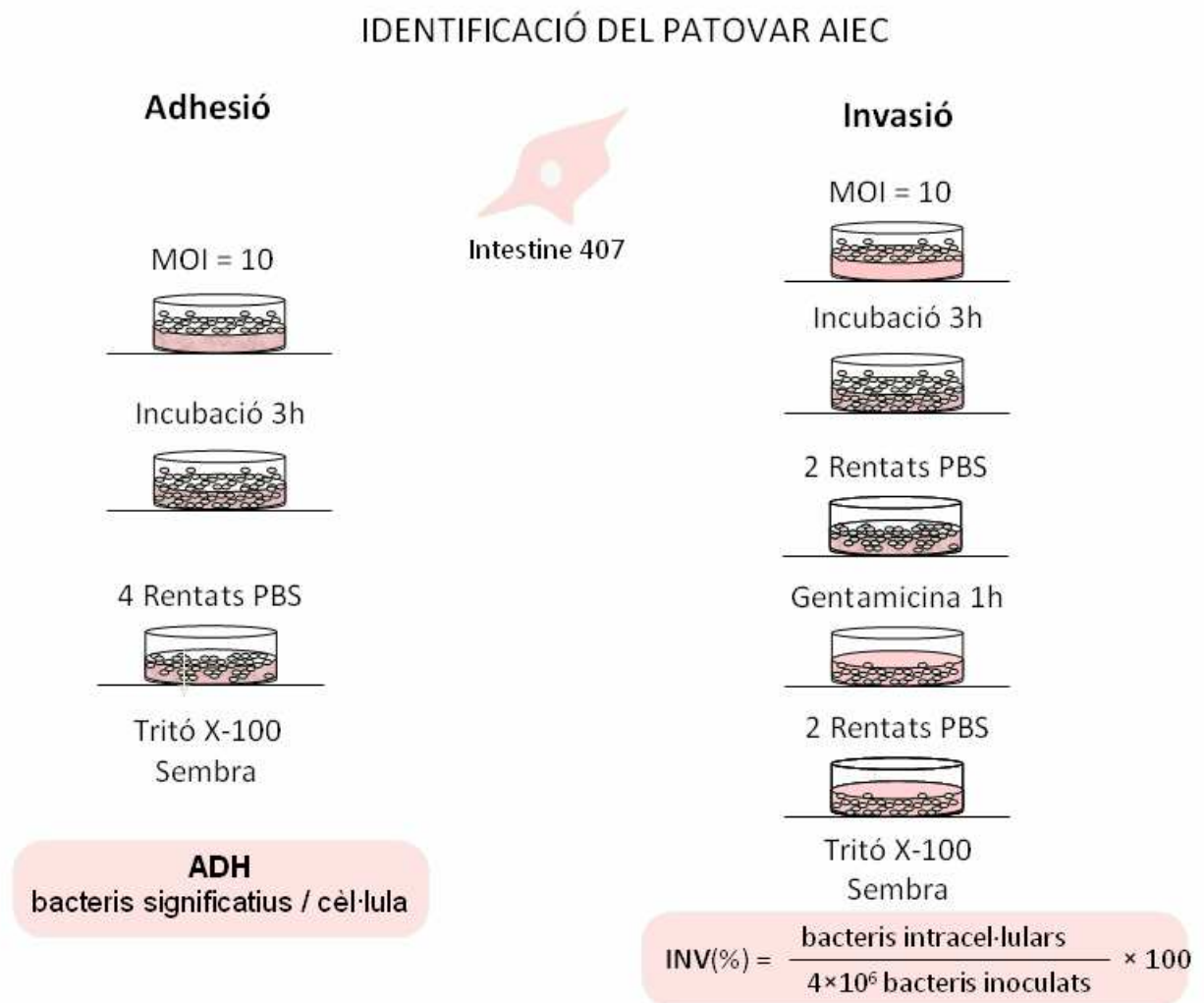


Figura 11. Esquema dels assajos d'adhesió i invasió i càlcul dels seus respectius índex
 Font: Darfeuille- Michaud i altres (2004), Gastroenterology

6.3. Resultats

De les tres sèmbrs de cada soca en cada assaig, en vam triar una en la qual el nombre de colònies estigués entre les 50 i les 150, i les vam comptar. Cada colònia prové d'una ufc (unitat formadora de colònia) i, generalment, cada bacteri sembrat n'és una.

Llavors, fent els càlculs corresponents (detallats a l'Annex-3) vam saber aproximadament el nombre total de bacteris que hi havia a cada pou on s'havien realitzat els assajos.

Finalment, per a calcular els índex d'invasió i adhesió, vam utilitzar les següents fórmules:

$$ADH = \frac{n^{\circ} \text{ bacteris}}{n^{\circ} \text{ cèl·lules}} \quad \text{INV (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ bacteris (intracel·lulars)}}{4 \cdot 10^6 \text{ bacteris inoculats}} \cdot 100$$

Un cop calculats aquests índex dels tres assajos sobre cada soca, vam calcular les mitjanes i desviacions típiques de cada soca (les taules amb els recomptes de colònies i amb les mitjanes i desviacions de cadascuna es troben a l'Annex-3).

Per a considerar que una soca és AIEC, els seus índex mitjans han de ser: ADH≥1 i INV≥0,1.

Tot seguit, com que aquestes soques es classifiquen en tres grups segons el tipus de pacient del qual provenguin, vam:

a) calcular la mitjana i la desviació típica de cada grup. Aquests resultats es troben en les Taules 1, 2 i 3, en les quals hi ha representades, de cada aïllat, les mitjanes dels índex d'adhesió i d'invasió respectivament (en vermell, els índex d'adhesió superiors a 1 i els d'invasió superiors a 0,1). Al final hi ha calculada la mitjana d'aquests índex i la seva desviació típica.

SOCA	ADH_I	INV_I
ENT CAI 1	9,17	0,050
ENT CAI 5	10,22	0,030
ENT CAK 1	0,73	0,018
ENT CAK 3	0,84	0,023
ENT CAL 2	2,90	0,070
ENT CAL 5	0,61	0,002
ENT CAP 1	0,52	0,012
ENT CBD 1	0,24	0,025
ENT CBD 10	0,38	0,022
ENT CBE 10	0,12	0,004
ENT CBE 9	0,64	0,016
ENT CBG 3	0,09	0,039
ENT CCI 1	1,18	0,026
ENT CCM 1	1,40	0,066
mitjana	2,074	0,029
desv. típica	3,311	0,021

Taula 1. Cefiàcs actius

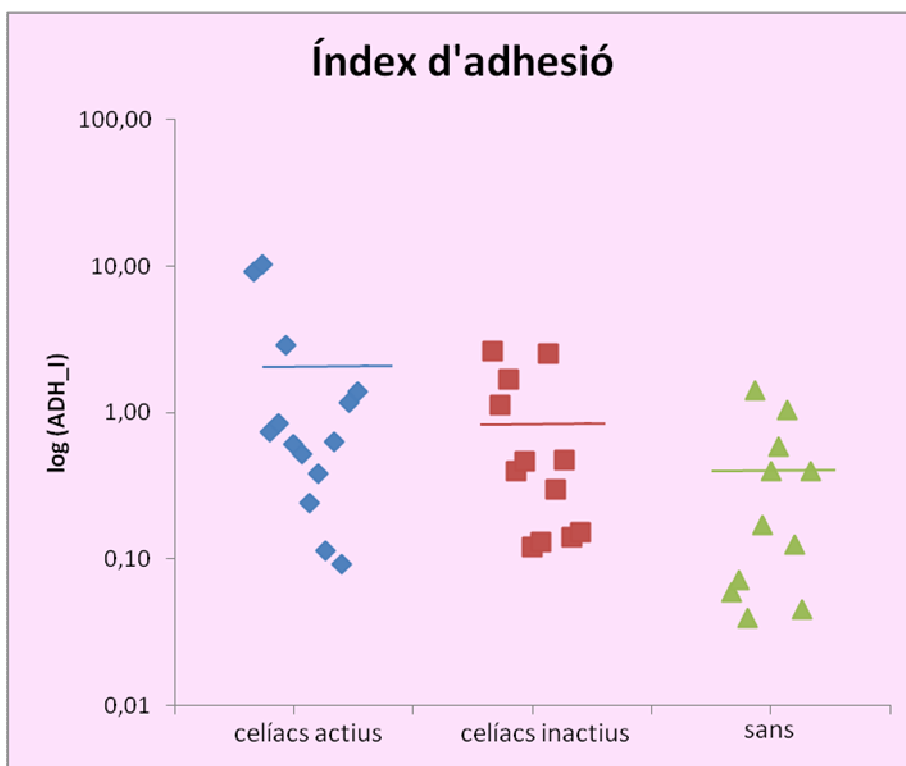
SOCA	ADH_I	INV_I
ENT CBJ 1	2,62	0,008
ENT CBL 2	1,13	0,002
ENT CBM 1	1,68	0,040
ENT CBN 1	0,40	0,020
ENT CBN 8	0,46	0,012
ENT CCC 1	0,12	0,007
ENT CCC 4	0,13	0,007
ENT CCD 1	2,53	0,047
ENT CCH 1	0,30	0,002
ENT CCH 3	0,48	0,003
ENT CCJ 1	0,14	0,000
ENT CCJ 5	0,15	0,001
mitjana	0,844	0,012
desv. típica	0,931	0,016

Taula 2. Cefiàcs inactius

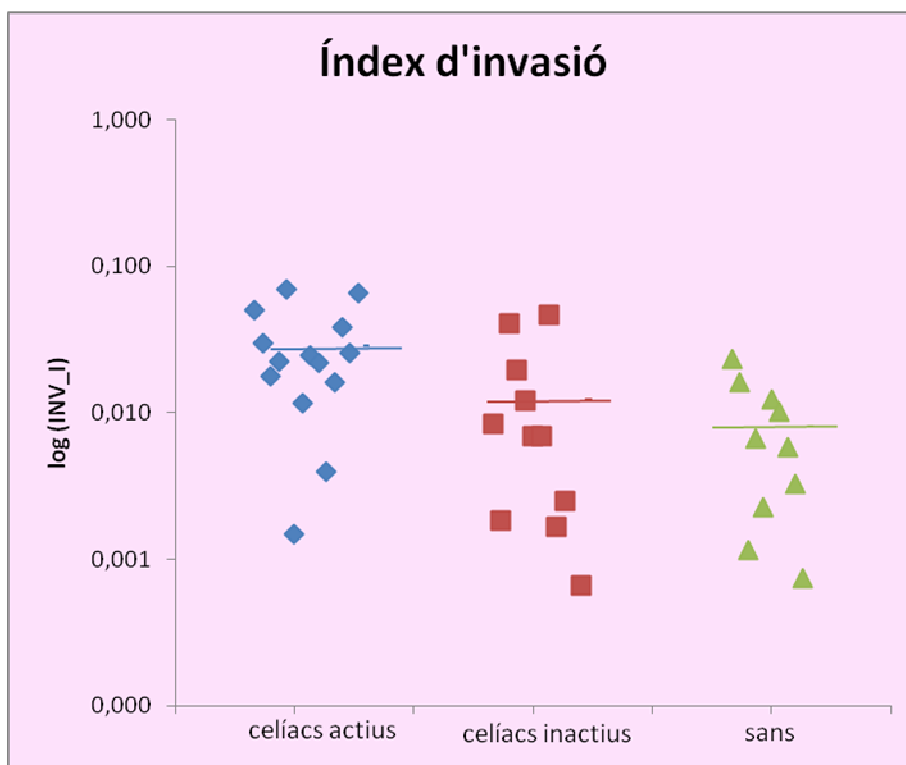
SOCA	ADH_I	INV_I
ENT CAJ 1	3,375	4,275
ENT SAB 5	0,06	0,023
ENT SAD 1	0,07	0,016
ENT SAG 5	0,04	0,001
ENT SAF 3	1,19	0,900
ENT SAH 4	1,42	0,007
ENT SR 1	0,17	0,002
ENT SR 2	0,40	0,012
ENT SS 1	0,59	0,010
ENT SS 2	1,05	0,006
ENT ST 1	0,13	0,003
ENT ST 5	0,05	0,001
mitjana	0,510	0,096
desv. típica	0,973	1,235

Taula 3. Pacients sans

b) representar les mitjanes dels índex de les diferents soques gràficament. Això es troba en els Gràfics 1 i 2, en els quals cada punt representa l'índex d'adhesió o invasió de cada aïllat, classificats pel grup al qual pertanyen, i el segment marca el valor mitjà d'aquests índex de cada grup.



Gràfic 1. Índex d'adhesió



Gràfic 2. Índex d'invasió (En la representació dels índex dels pacients sans i en el càlcul de la mitjana del mateix grup he omès els dos aïllats que s'han confirmat com a AIEC perquè donaven valors extrems dispersos que distorsionaven els resultats.)

6.4. Interpretació dels resultats i conclusions

Dels tres grups de pacients s'observa que:

- De les 14 soques de pacients celíacs actius n'hi ha 5 que tenen un índex d'adhesió superior a 1, però en cap cas superen el 0,1 en l'índex d'invasió. Per tant, cap d'aquestes es considera AIEC.
- De les 12 soques de pacients celíacs inactius n'hi ha 4 que tenen un índex d'adhesió superior a 1, però en cap cas superen el 0,1 en l'índex d'invasió. Per tant, cap d'aquestes tampoc es considera AIEC.
- De les 12 soques de pacients sans n'hi ha 4 que tenen un índex d'adhesió superior a 1, i dos d'aquests casos també superen el 0,1 en l'índex d'invasió. Aquestes dues soques, analitzades per M. Martínez, van donar un índex superior al 100% en l'assaig de supervivència i replicació en macròfags i, per tant, poden ser considerades AIEC.

Aquest resultat és coherent amb el d'altres estudis que indiquen una presència d'AIEC d'entre 5 i 16% en pacients sans.

**A partir d'aquests resultats es conclou que l'AIEC no està associat a la celiàquia.
Per tant, la hipòtesis inicial queda refutada i, de moment, aquest patovar es
continua associant únicament a la malaltia de Crohn.**

D'altra banda, s'observa que tant en l'índex d'adhesió com al d'invasió es compleix que el de celíacs actius és una mica més elevat que en el d'inactius i, aquest, una mica més que el dels pacients sans (a excepció dels dos aïllats que es confirmen com a AIEC), a la qual cosa no n'he pogut deduir cap explicació.

7. Conclusions

En primer lloc cal destacar que en el meu treball experimental no s'ha confirmat la hipòtesi inicial, ja que no s'ha trobat el patovar AIEC en cap dels pacients celíacs. Això pot ser considerat positiu perquè descarta una problemàtica en els celíacs. Pel que fa a l'aplicació mèdica dels meus resultats, si s'acaba confirmant que l'AIEC és específic de la malaltia de Crohn, aquest fet pot ajudar a buscar millors tractaments per a la malaltia i fins i tot la cura. La hipòtesi inicial, en la que vaig pronosticar que l'AIEC podria estar present a l'intestí dels malalts de celiàquia degut a que les *E. coli* dels pacients amb celiàquia s'assemblen genèticament al patotipus AIEC, és raonable que no s'hagi complert, ja que genotípicament es poden assemblar molt tipus diferents d'*E. coli*, i més encara si no s'han pogut comparar específicament els gens de virulència, ja que no es coneixen els de l'AIEC. D'altra banda, quedaria per a resoldre perquè tant en l'índex d'adhesió com al d'invasió es compleix que el de celíacs actius és una mica més elevat que en el d'inactius i, aquest, una mica més que el dels pacients sans (a excepció dels dos aïllats que es confirmen com a AIEC).

La realització d'aquest treball no ha estat fàcil, però ha valgut la pena. Pel que fa a la part teòrica, he après molt sobre la flora intestinal i els trastorns que s'hi produeixen, ja que era un tema del qual no en tenia gaire coneixement abans. Sabia que tenim molts bacteris al nostre aparell digestiu que ens ajuden a digerir els aliments, però ara he conegut altres funcions que també duen a terme, com mantenir equilibrada les poblacions d'altres tipus de bacteris que poden ser nocius per a nosaltres. D'altra banda trobo curiós que una espècie com és l'*Escherichia coli* que sovint és beneficiosa pel nostre organisme, en ocasions pot ser molt nociva, ja que algunes varietats d'aquesta són patògenes. Aquesta espècie és molt present en estudis científics, ja que és fàcilment manipulable al laboratori, i és el bacteri del qual havia sentit a parlar més. M'ha sorprès l'enorme varietat que hi arriba haver d'una sola espècie de bacteri, i per això jo m'he centrat només en les varietats que causen malalties intestinals. A més, malgrat ser l'organisme del qual se'n té més coneixement biomolecular, encara falta molt per arribar a conèixer-lo del tot. Per això s'estan duent a terme estudis com el que pretén descobrir la implicació de l'AIEC en diverses malalties intestinals.

Del que n'he tret més profit, però, han estat els experiments al laboratori, que m'han servit per a familiaritzar-me amb la microbiologia experimental, preparant cultius cel·lulars bacterians i manipulant-los. Com que tinc pensat continuar els estudis a la branca de

biologia, crec que aquests experiments m'han servit molt per agafar experiència al laboratori i ajudar-me a veure si realment és el que m'esperava de la biologia o no, i en aquest sentit n'he quedat força contenta. Una de les coses que m'ha impactat més, a part que s'ha de vigilar en desinfectar tot el material que s'utilitza per a no contaminar les mostres, ha estat la gran quantitat de residus que es generen, ja que molts estris que es fan servir són d'un sol ús, al treballar amb bacteris.

En general, crec que m'ha ajudat a millorar les meves tècniques de recerca d'informació, de resumir-la i redactar-la. Pel que fa a la part experimental m'ha servit molt per a l'anàlisi de resultats i l'extracció de conclusions, feines que no m'han estat fàcils, ja que no estava acostumada a treballar amb tantes dades i al principi m'hi vaig quedar encallada. En definitiva, ha estat una experiència interessant ja que n'he tret molt profit i m'ha agradat poder fer aquest treball, tant la part teòrica com l'experimental, pertanyent a un projecte científic que s'està duent a terme actualment, fet que intriga ja que els resultats finals de l'estudi de l'AIEC encara no se saben, encara s'ha d'estudiar la seva presència en les altres malalties intestinals i confirmar que no són presents a la celiaquia.

Agraïments

Aquest treball ha estat possible gràcies al suport que he estat rebent durant aquests mesos. En primer lloc, gràcies a que m'han concedit la Beca Botet i Sisó i el Jove Campus de Recerca he pogut estar tutoritzada per la doctora Margarita Martínez del Grup de Microbiologia Clínica i Malalties Infeccioses de la Universitat de Girona, qui m'ha guiat sobretot en la part experimental i a interpretar els resultats, i gràcies a això he pogut treure molt profit a les feines que he estat fent al laboratori. El que m'ha guiat la meva tutora de l'institut, Anna Sàbat, també m'ha servit molt ja que des del principi em vaig haver d'encarar a documents amb un llenguatge científic al que no estava acostumada i a conceptes que no coneixia, i m'ha ajudat a interpretar-los i comprendre'ls, a més de guiar-me en el dia a dia de la realització del treball en general. Per últim volia agrair al meu pare el que m'ha recolzat quan em quedava encallada i en ajudar-me quan ho necessitava a l'hora d'estructurar la memòria i revisar-la.

Bibliografía i webgrafía

García-Gil L. J., (2012) *Escherichia coli adherente invasiva (AIEC): distribución en otras enfermedades intestinales distintas de Crohn y determinantes génicos implicados en su patogenicidad*. Convocatoria de ayudas de Proyectos de Investigación Fundamental no orientada. Memoria técnica.

Glasser A-L, Darfeuille-Michaud A. (2008) Abnormalities in the handling of intracellular bacteria in Crohn's disease: a link between infectious etiology and host genetic susceptibility. *Arch. Immunol. Ther.* Vol. 5, p. 237-244

Martínez-Medina, M. (2009) *Intestinal microbiology in Crohn's disease: a study of Escherichia coli as a potential etiologic agent*. Tesi doctoral. Universitat de Girona.

James B. Kaper, James P. Nataro, Harry L. T. Mobley (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*. Vol. 2, p. 123-138

Martínez-Medina M., Aldeguer X., López-Siles M. i altres (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. *Inflamm Bowel Dis.* Vol. 15, No 6, p. 872-881

Sánchez E., Nadal I., Donat E., Ribes-Koninckx C., Calabuig M., Sanz Y. (2008) Reduced diversity and increased virulence-gene carriage in intestinal enterobacteria of coeliac children. *BMC Gastroenterology*. Vol. 8, No 50

Sanz Y., Collado M.C., Haros M., Dalmau J. (2004) "Funciones metabólicas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos", *Acta Pediátrica Espanyola*, Vol. 62, No 11, p. 520-521

Á. Méndez. *Glicerol* [en línea]
<<http://quimica.laquia2000.com/compuestos-quimicos/glicerol>>
[Consulta: 18 de juny 2012]

Clínica Universidad de Navarra *Gentamicina* [en línea]
<<http://www.plusesmas.com/salud/medicamentos/gentamicina/2395.html>>
[Consulta: 18 de juny 2012]

Cultek. *Introducción a los cultivos celulares* [en línea]
<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Cultivos_celulares-Introduccion.pdf>
[Consulta: 19 de juny 2012]

Dr. Franklin Aranda. *Colonización bacteriana intestinal* [en línea]
<<http://es.scribd.com/doc/39931824/Colonizacion-Bacteriana-de-la-Mucosa-Intestinal>>
[Consulta: 11 de maig 2012]

Dr Tango, Inc. *Respuesta inmunitaria* [en línea]
<<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000821.htm>>
[Consulta: 11 de maig 2012]

Fundación Eroski. *Escherichia coli* [en línea]

<<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2003/11/07/9262.php>>

[Consulta: 25 de maig]

Geosalud. *Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn* [en línia]

<<http://geosalud.com/Digestivo/colitisulcerosa2.htm>>

[Consulta: 20 de maig 2012]

LGC Standards. *Intestine 407 cells* [en línia]

<<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-6&Template=cellBiology>>

[Consulta: 18 de juny 2012]

Marienfeld Laboratory Glasswear. *Cámara de Neubauer* [en línia]

<<http://es.scribd.com/doc/55063448/Camara-de-neubauer>>

[Consulta: 19 de juny 2012]

Protocols online. *Phosphate buffered saline* [en línia]

<http://protocolsonline.com/recipes/phosphate-buffered-saline-pbs/>

[Consulta: 18 de juny 2012]

Rubilabor. *L.B. Medium (Luria Bertani)* [en línia]

<<http://www.rubilabor.com/ftp/productos/20101404101737.pdf>>

[Consulta: 14 de juny 2012]

Sigma. *Triton X-100* [en línia]

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t8532pis.Par.0001.File.tmp/t8532pis.pdf>

[Consulta: 19 de juny 2012]

Thermo Cientific. *Tryptone Bile X-Glucuronide Medium (TBX)* [en línia]

<http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0945&org=71&c=UK>

[Consulta: 13 de juny 2012]

Glossari

Les paraules definides aquí apareixen al text en cursiva i marcades amb un asterisc.

- **Apoptosi** → mecanisme de mort cel·lular programada genèticament que permet l'eliminació de cèl·lules envellides, malmeses o que sobren.
 - **Patogen** → agent que causa malalties o infeccions a l'hoste.
 - **Patogen facultatiu** → patogen que es comporta com un mutualista o comensal però que en condicions determinades (per exemple, en una baixa de defenses de l'hoste) desencadenen una malaltia.
 - **Patogènesi** → desenvolupament d'una malaltia.
 - **Patotip** → grup de soques d'una sola espècie que causen una malaltia comuna utilitzant un conjunt comú de factors de virulència.
 - **Patovar** → soca o soques d'un bacteri amb característiques iguals o similars, que estan diferenciades dins d'una espècie o subespècie per la patogènesi que presenten.
 - **Soca** → subtipus o variant genètica d'un virus o bacteri, també anomenat cep.
 - **Virulència** → qualitat que té un organisme de ser patogen.
-
- **Relacions interespecífiques** entre organismes de diferents espècies:
La **simbiosi** és la dependència mútua entre dos o més organismes de diferents espècies, en què tots els organismes que hi intervenen en treuen algun profit (alimentari, de protecció, de transport...). Generalment, els individus simbiotes no poden viure sense l'altre individu, però també n'hi ha que no són dependents entre ells, i conviuen en **mutualisme**. En el **parasitisme** un dels individus, el paràsit, es beneficia de la relació, mentre que l'altre, l'hoste, no ho fa, i moltes vegades en surt perjudicat. Quan els lligams són alimentaris i se situen entre la simbiosi i el parasitisme s'anomena **comensalisme**.

ANNEXOS

Annex-1:

El laboratori de microbiologia

A la Universitat de Girona vaig treballar en tres laboratoris diferents del Departament de Biologia, ja que havia de fer tasques molt diverses: des de preparar medis de cultiu a preparar cultius cel·lulars o manipular bacteris nocius. Com que són molt més complexos que el que havia utilitzat fins ara a l'institut, em vaig haver d'informar sobre com treballar-hi amb seguretat i sobre el material i els productes utilitzats, ja que molts no els coneixia. En aquest annex he recollit les principals coses que han estat novetat per a mi d'utilitzar.

Com a mesures de seguretat, era molt important utilitzar bata de laboratori i guants, no menjar ni beure a dins i rentar-se les mans amb sabó desinfectant abans de posar-se a treballar i després. Com que treballàvem amb organismes patògens, és a dir, que ens poden causar mal, era molt important vigilar en la seva manipulació, i ho fèiem en la campana estèril perquè no se'ns contaminessin les mostres amb els bacteris de l'aire, cosa que ens hagués impedit realitzar l'experiment. Després d'utilitzar el material, la major part d'aquest, al ser d'un sol ús, s'havia de llençar en uns contenidors especials de material de risc biològic per a ser tractats de manera especial.

Una altra cosa a tenir en compte és que, com que utilitzàvem moltes mostres de bacteris diferents, els recipients com plaques de Petri o tubs de vidre sempre s'havien de retolar amb el codi de la mostra que contenien.

A1.1. Matèria viva

- **Bacteris utilitzats** → els aïllats bacterians que vam utilitzar provenien de mostres fecals de 31 pacients menors de 13 anys, 10 dels quals eren celíacs actius (la seva dieta conté gluten), 10 celíacs inactius (la seva dieta no conté gluten des de fa més d'un any) i 11 controls sans (no tenen intolerància coneguda a aliments. Cap dels nens inclosos en l'estudi havien estat tractats amb antibiòtics durant almenys 1 mes abans que el temps de mostreig. A més, les mostres fecals van ser recollides i emmagatzemades immediatament a 4 ° C, en condicions anaeròbies.

- Cèl·lules utilitzades

El cultiu cel·lular que hem utilitzat per infectar estava format per cèl·lules d'epitel·li intestinal humà anomenades *intestine-407* (I-407), procedents de LGC, una empresa que es dedica a distribuir cultius i bioproductes a investigadors de ciències biològiques a tot Europa.

Per a créixer necessiten estar en medi EMEM amb un 10% de sèrum boví fetal amb una atmosfera d'aire amb un 5% de diòxid de carboni i a una temperatura de 37°C.

A1.2. Medis de cultiu i altres líquids

- PBS i Ringer

Tant el PBS (Phosphate Buffered Saline) com el Ringer són dissolucions salines tampó amb una pressió osmòtica adient per a alguns tipus de cèl·lules perquè és semblant a la seva, de manera que fan que no es trenquin. En canvi, en aigua destil·lada per exemple, les cèl·lules rebenten perquè s'omplen d'aigua pel procés d'osmosi.

Es diferencien en què el **PBS** serveix per a no fer malbé les cèl·lules eucariotes ni els bacteris, i el Ringer tan sols no fa malbé els bacteris (que són molt més resistents) i per això quan no ens cal conservar cèl·lules eucariotes o no en tenim, amb el **Ringer** n'hi ha prou perquè és més barat.

La gentamicina que posem està dissolta amb PBS (dissolució salina) i els rentats que fem als pous amb cèl·lules també són amb PBS perquè és un medi inert (no conté nutrients).

- **Medi EMEM** (Essential Medium Eagle Minimum, medi essencial mínim d'Eagle) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal, que conté nutrients utilitzat pel cultiu de les cèl·lules intestinals.

- **Antibiòtic gentamicina**

La gentamicina és un antibiòtic aminoglucòsid que es fa servir per tractar diversos tipus d'infeccions bacterianes, particularment aquelles causades per organismes Gram-negatius, però només en casos en què l'administració d'altres antibiòtics menys potents hagi estat ineficaç, ja que és molt tòxic i té molts efectes secundaris. Aquesta molècula, sintetitzada pel gènere de bacteris Gram-positius *Micromonospora*, funciona enllaçant la subunitat 30S del ribosoma d'alguns bacteris, interrompent la síntesi de proteïnes.

- **Glicerol o glicerina**

El glicerol és un compost orgànic líquid viscos a temperatura ambient, incolor, inodor i soluble en aigua. És el component central de diversos lípids i té aplicacions molt diverses, com en indústries d'investigació, farmacèutiques i alimentàries o en la fabricació de polímers.

L'hem utilitzat dissolt en els tubs Eppendorf on hi havia les soques bacterianes per a congelar, ja que els redueix la temperatura de congelació i el dany produït pels cristalls de gel en aquests organismes quan són congelats.

- **Tripsina i Tritó**

La **tripsina** és un enzim que trenca els enllaços peptídics de les proteïnes mitjançant la hidròlisi per a formar pèptids més petits i aminoàcids. Això s'utilitza per a desenganxar les cèl·lules cultivades del recipient i també les dissocia entre elles.

El **Tritó-X 100** és un compost químic amb moltes aplicacions al laboratori, entre elles la de provocar mort cel·lular ja que trenca les membranes de la cèl·lula.

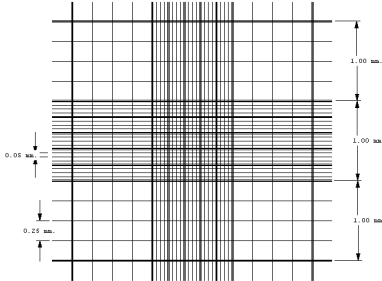
A1.3. Material

- **Cambra de Neubauer**

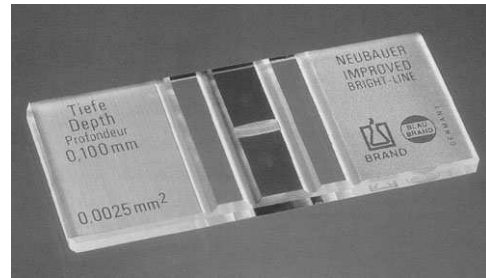
La Cambra de Neubauer és un instrument que serveix pel recompte de cèl·lules en un medi líquid d'un cultiu cel·lular, per exemple, i es tracta d'un portaobjectes al qual hi ha marcada una quadrícula. Per utilitzar-ho s'hi col·loquen les cèl·lules en medi líquid, es tapa amb el cobreobjectes, es col·loca al microscopi amb l'augment adequat i es compten les cèl·lules que hi ha en la quadrícula. Com que les dimensions de la Cambra són conegudes la dilució del cultiu cel·lular també, si és que ha estat diluït, per a saber el

nombre de cèl·lules totals que hi ha al cultiu només caldrà fer algun càlcul, generalment el següent:

$$\text{partícules / ml} = \frac{\text{partícules_comptades}}{\text{superfície_utilitzada(mm}^2\text{)} * \text{profunditat_de_càmbra(mm)} * \text{dilució}}$$



Quadrícula d'una cambra de Neubauer
Font:
http://2.bp.blogspot.com/_wVtr4eTLiKE/SwsA692FZtI/AAAAAAAAAEQ/C2-L_h7VADM/s1600/camara+neubauer.gif



Cambra de Neubauer
Font: <http://2.bp.blogspot.com/-DZqkxUo0c4Q/Tbka4bc6RLI/AAAAAAAAAMA/fm5Lk-NP33A/s1600/camara+recuento+neubauer.jpg>

- Micropipeta amb puntes estèrils i pipeta amb pipetejador automàtic

Una micropipeta és un instrument de mesura de volums de líquids d'entre 1 i 1 000 µl, i per a volums superior s'utilitzen les pipetes. Al treballar amb bacteris que no es poden contaminar, per cada utilització s'ha de canviar la part de la micropipeta que toca el líquid agafat, és a dir, la punta que era estèril, i llençar-la un cop utilitzada. Les pipetes que utilitzem també són estèrils però com que només els omplim amb medis de cultiu estèrils no cal canviar-los tan sovint. Per a succionar el líquid amb les pipetes utilitzem un pipetejador automàtic.



Micropipeta amb punta
Font:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/66/Micropipeta_icona.png



Pipetes
Font:
<http://www.bjmultech.com/CN/upload/2010/10/160119.jpg>



Pipetejador automàtic
Font:
http://www.sanilaboshop.es/WebRoot/StoreLES/Shops/62425883/4B96/1BD8/3374/831A/B440/C0A8/2A95/01C3/pipet4u_oasis.jpg

- Plaques multipouets

Plaques de plàstic amb nombroses cavitats o pouets (les meves en tenien 24) per a realitzar cultius cel·lulars.



Plaques multipouets

Font: <http://www.invitro.com.au/assets/Uploads/ProductImages/COR3396-1.jpg>

A1.4. Aparells

- Autoclau

L'autoclau és un dispositiu que serveix per esterilitzar material de laboratori utilitzant vapor d'aigua a alta pressió i temperatura. Amb l'elevada pressió s'evita que l'aigua arribi a bullir tot i l'alta temperatura. El seu fonament és que desnaturalitza les proteïnes dels microorganismes degut a la pressió i la temperatura, i gairebé cap organisme és capaç de suportar-ho.



Autoclau

Font: http://www.scientistlive.com/media/images/319446_fullsize.jpg

- Incubadora

Una incubadora és un dispositiu que serveix per mantenir i fer créixer cultius cel·lulars, tant bacterians com de cèl·lules eucariotes. La incubadora manté la temperatura, la humitat i altres condicions en grau òptim, com ara el contingut de diòxid de carboni i d'oxigen en la seva atmosfera interior.



Incubadora

de-laboratorio-257564.jpg

Font: http://4.bp.blogspot.com/_yzYXeu1b_hl/S7gVjNDVfZI/AAAAAAAAAFY/e5gywJWnono/s1600/incubadora-de-laboratorio-257564.jpg

- Agitador vòrtex

Un vòrtex és un tipus d'agitador que s'utilitza per a homogeneïtzar el contingut de petits tubs o flascons de líquid. Quan aquest flascó es col·loca en el suport de goma, que està en constant moviment de rotació, el moviment es transmet al líquid en el seu interior i es crea un vòrtex.



Vòrtex

Font: <http://www.somatco.com/images/1887-176.JPG>

- Centrífuga i tubs de centrífuga

Una centrífuga o centrifugadora és una màquina que posa en rotació una mostra per a separar per força centrífuga els seus components en funció de la seva densitat. S'utilitza principalment per a accelerar el procés de sedimentació



Centrífuga i tubs de centrífuga

Font: <http://scientiis.com/laboratorium/catalog/images/Laboratory/spectrafuge6C.jpg>

- Campana de flux laminar

Una cabina, càmera o campana de flux laminar és un recinte que utilitza un ventilador per forçar el pas d'aire a través d'un filtre i proporcionar a la zona de treball aire net lliure de partícules, per a no contaminar cultius cel·lulars que s'hagin de manipular a l'interior.



Campana de flux laminar

Font: <http://www.biogen.es/biogenshop/catalog/images/Telstar/H-100.jpg>

Annex-2:

Tasques prèvies a l'experiment d'identificació de l'AIEC

A2.1. Preparació dels medis de cultiu cel·lular

a) Preparació del TBX amb agar

- Informació prèvia

L'Agar amb TBX (Tryptona bilis X-glocuronid) és un medi de cultiu selectiu que s'utilitza per a la identificació i enumeració del bacteri *Escherichia coli*. En 24 hores d'incubació s'obtenen els resultats: es pot saber segur si el bacteri que hi havia era l'*E. coli* (ja que només les colònies d'*E. coli* poden tenir un color blau-verd en aquest medi) però no del tot segur si no ho és (perquè un 3-4% d'*E. coli* no queden d'aquest color perquè són glucuronidasa negatives) i també el nombre de bacteris que hi havia només comptant les colònies que s'han format (ja que cada bacteri aïllat forma una colònia).

Aquest medi està format per:

- **Agar** (15 mg/L) → és l'agent solidificant perquè és una gelatina.
- **Tryptona** (20 mg/L) → proporciona nitrogen, vitamines i aminoàcids.
- **Sals biliars** (1,5 mg/L) → són l'agent selectiu contra bacteris Gram-positius, bacils i estreptococs fecals, i provenen dels àcids biliars.
- **X-glucuronid** (0,075 mg/L) → és l'agent selectiu per diferenciar l'*E. coli* dels altres bacteris coliformes, que tenen la forma i característiques bioquímiques en comú. Aquest substrat cromogènic de fórmula 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucuronid és absorbit per l'*E. coli*. L'enzim β -D-glucuronidasa, característic d'aquest bacteri, trenca la unió entre el cromòfor (part de la molècula que conté el color) 5-bromo-4-cloro-3-indolyl i el β -D-glucuronid. El cromòfor alliberat s'acumula dins les cèl·lules i, com que és de color, les colònies d'*E. coli* són de color blau-verd. Tot i això, un 3-4% de les soques d'aquest bacteri són glucuronidasa negatives, és a dir, que no contenen l'enzim glucuronidasa i, per tant, podem creure que no és *E. coli* quan sí que ho és.

Aquest medi és de color beix clar, deshidratat en forma de pols i preparat, en gel.

Si els nostres cultius bacterians es desenvolupen, podem esperar dos resultats:

- que les colònies siguin de color blau-verd → sabem segur que es tracta d'*E. coli*
- que les colònies siguin de color palla → molt possiblement no siguin d'*E. coli*, tot i que

no en podem estar segurs perquè aproximadament, el 3-4% d'*E. coli* són glucuronidasa negatives.

S'han de prendre precaucions perquè és irritant per als ulls, el sistema respiratori i la pell.

- Material

Matràs Erlenmeyer	Autoclau
Balança	pH metre
Espàtula	Agitador magnètic amb la mosca
Vidre de rellotge	
Paper d'alumini	Medi TBX deshidratat
Cinta d'autoclau	H ₂ O destil·lada
45 Plaques de Petri estèrils	

- Procediment

1- Es calcula la quantitat de TBX deshidratat que es necessitarà:

Tenint en compte que cada placa de petri ha de contenir aproximadament 25 ml de medi i que es necessitaven 45 plaques, una per a cada aïllat, es van preparar un total de 1400 ml de medi TBX tenint en compte una mica més per si sorgís algun imprevist.

Les indicacions del fabricant indiquen que cal preparar el medi TBX a una raó de 36,6 g/L. Per tant, en els 1,4 L vàrem posar 51,24 g de TBX.

2- Es mesura 1,4 L d'H₂O destil·lada i se'n posa una mica en un Erlenmeyer.

3- Es mesuren els 51,24 g de TBX en pols, es tiren a l'Erlenmeyer i es barreja.

4- S'acaba d'afegir l'H₂O destil·lada a l'Erlenmeyer i es barreja amb un agitador magnètic.

5- Es mesura el pH de la dissolució. Segons el que indica l'ampolla, ha de ser de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C. Com que era dins del marge de tolerància, no cal millorar-ho afegint-hi àcid ni base.

6- Es tapa l'Erlenmeyer amb el paper d'alumini, es precinta amb la cinta d'autoclau i s'introdueix a l'autoclau per tal d'esterilitzar el medi.

7- Al cap de 1,5 h, amb la dissolució encara calenta perquè l'agar no se solidifiqui (aproximadament a 60°C) , es reparteix en les 45 plaques de Petri.



b) Preparació de l'LB amb agar

- Informació prèvia

El medi LB és un medi per mantenir i cultivar de soques d'*Escherichia coli*.

Aquest medi està format per:

- **Triptona** (10 g/L) → proporciona nitrogen i carboni.
- **Extracte de llevat** (5 g/L) → proporciona vitamines (incloent-hi del complex B)
- **Clorur sòdic** (5 g/L) → proporciona ions sòdics per al transport i l'equilibri osmòtic

Aquest medi deshidratat és en pols i de color beix clar i, preparat, és líquid de color ambre molt clar, molt transparent.

No cal prendre precaucions especials amb el producte perquè no conté substàncies nocives en concentracions notables.

- Material

Matràs Erlenmeyer	Autoclau
Balança	pH metre
Espàtula	Agitador magnètic amb la mosca
Vidre de rellotge	
Paper d'alumini	Medi LB deshidratat
Cinta d'autoclau	Agar deshidratat
Plaques de Petri estèrils	H ₂ O destil·lada

- Procediment

1- Es calcula la quantitat d'LB deshidratat que es necessitarà, tenint en compte que en aquest cas el volum per placa és de 40 ml, ja que aquestes plaques eren de mida més gran (12x12cm). Es varen preparar 2000 ml de medi LB.

L'ampolla de l'LB deshidratat indica que la concentració de la dissolució d'LB per a emplacar ha de ser de 20 g/L. Aquest medi preparat no conté agar, així que s'afegeix a la solució a raó de 20 g/L. Per tant, en els 2 L s'han de posar 40 g d'LB i 40 g d'agar.

2- Es mesura 2 L d'H₂O destil·lada i se'n posa una mica en un Erlenmeyer.

3- Es mesuren els 40 g d'LB en pols i 40 g d'agar, es tiren a l'Erlenmeyer i es barreja.

4- S'acaba d'afegir l'H₂O destil·lada a l'Erlenmeyer i es barreja amb un agitador magnètic.

5- Es mesura el pH de la dissolució. Segons el que indica l'ampolla, ha de ser de 7, ± 0,2 a 25°C. Com que era dins del marge de tolerància, no cal millorar-ho afegint-hi àcid ni base.

6- Es tapa l'Erlenmeyer amb el paper d'alumini, es precinta amb la cinta d'autoclau i

s'introdueix a l'autoclau.

7- Al cap de 1,5 h, amb la dissolució encara calenta perquè l'agar no se solidifiqui i es pugui emplaçar bé, es reparteix en les plaques de Petri.

c) Preparació de l'LB líquid

- Material

Erlenmeyer	Autoclau (aparell per a esterilitzar)
Balança	pH metre
Espàtula	Agitador magnètic amb la mosca
Vidre de rellotge	
Paper d'alumini	Medi LB deshidratat
Cinta d'autoclau	H ₂ O destil·lada
Pots de vidre estèrils	

- Procediment

1- Es calcula la quantitat d'LB deshidratat que es necessitarà:

S'havien de col·locar 1,5 ml de la dissolució d'LB a cada tub de vidre, i hi havia 45 tubs perquè teníem 45 aïllats bacterians. Per tant, s'havien de preparar $45 \cdot 1,5 = 67,5$ ml de dissolució d'LB, però se'n va fet una mica més (200 ml) per si sorgís algun imprevist.

L'ampolla de l'LB deshidratat indica que la concentració de la dissolució d'LB ha de ser de 20 g/L. Per tant, en els 0,2 L s'han de posar 4 g d'LB.

2- Es mesura 0,2 L d'H₂O destil·lada i se'n posa una mica en un Erlenmeyer.

3- Es mesuren els 4 g d'LB en pols, es tiren a l'Erlenmeyer i es barreja.

4- S'acaba d'afegir l'H₂O destil·lada a l'Erlenmeyer i es barreja amb un agitador magnètic.

5- Es mesura el pH de la dissolució. Segons el que indica l'ampolla, ha de ser de $7, \pm 0,2$ a 25°C. Com que era dins del marge de tolerància, no cal millorar-ho afegint-hi àcid ni base.

6- Es tapa l'Erlenmeyer amb el paper d'alumini, es precinta amb la cinta d'autoclau i s'introdueix a l'autoclau.

7- Es deixa refredar ja que no solidifica perquè no hi ha agar i es passa de l'Erlenmeyer a pots de vidre estèrils per a guardar-ho i utilitzar-ho més endavant per a col·locar-ho en els tubs de vidre estèrils.

A2.2. Sombres en placa amb medi TBX

- Material

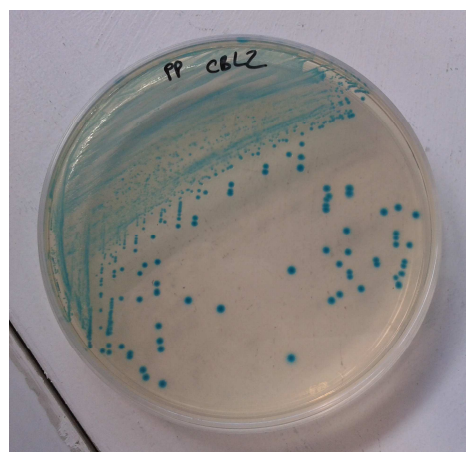
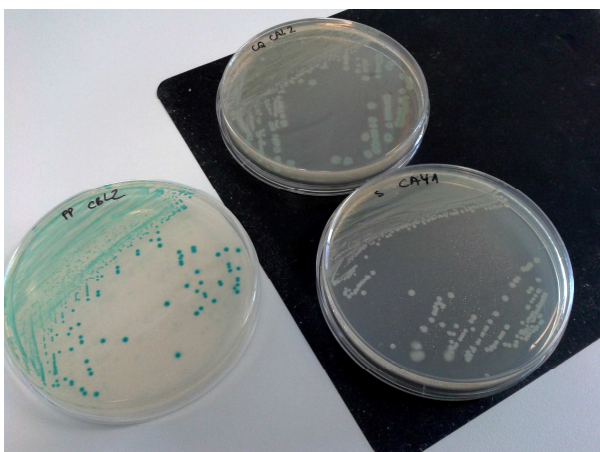
Micropipeta amb puntes estèrils	45 aïllats d' <i>E. coli</i> congelats
Retolador permanent	45 plaques de Petri amb medi TBX
Incubadora	

- Procediment

- 1- Es retolen les plaques amb TBX amb el codi de cada mostra que s'hi col·locarà.
- 2- Amb una micropipeta s'agafen uns 15 µL de cada soca continguda en un tub estèril (estoc) que estava a -80°C, i s'escampa aquesta quantitat per la placa amb medi TBX en forma d'estries.
- 3- Finalment s'introdueixen les plaques a la incubador a 37°C durant 24 h perquè es formin les colònies.

- Resultats i interpretació (detall del resultat de cada soca a l'Annex-3)

- 40 de les soques han quedat amb colònies de mida i forma semblant amb el color blau-verd esperat, i com que no cal confirmació en aquest medi sabem que es tracten d'*E. Coli*.
- 2 soques han quedat també amb colònies de mida i forma semblant però el color blau-verd és molt menys intens que en les altres. Tot i això, també es consideren glucuronidasa positives i sabem que es tracten d'*E. coli*.
- 2 soques han quedat amb colònies de mida i forma semblant però sense el color blau-verd esperat. Al ser soques glucuronidasa negatives, no podem saber si es tracta o no d'*E. coli*, ja que un 3-4% de les soques d'aquest bacteri ho són, i es necessitarà confirmació.
- 1 soca ha quedat amb les colònies de mida i forma diferents entre elles i només amb algunes d'elles de color blau-verd. En haver-hi tipus diferents de colònies significa que hi ha tipus diferents de bacteris i que aquesta soca ha estat contaminada. Per tant, s'ha de descartar de l'estudi.



A2.3. Sembres en medi líquid LB de les soques sembrades en placa

- Material

Nanses de plàstic estèrils

44 tubs de vidre estèrils

Pipeta estèril

Pipetejador automàtic

Gradeta

Retolador permanent

Medi LB líquid

Vòrtex

Incubadora

44 plaques de Petri amb el cultiu d'*E. coli*
en medi TBX

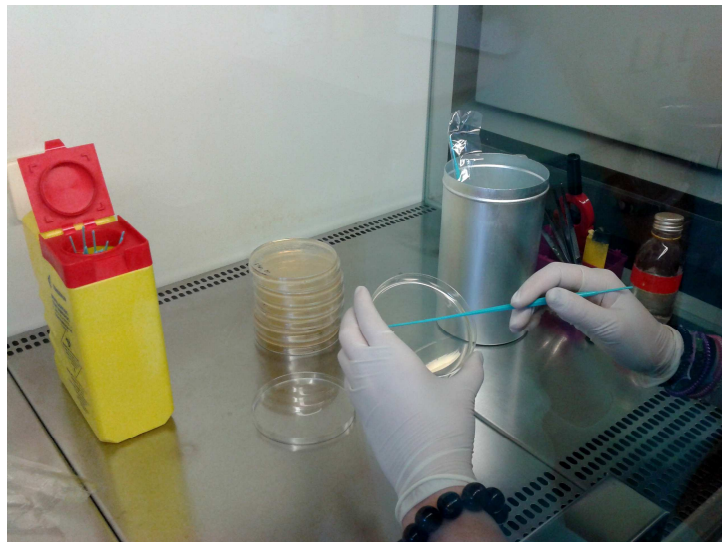
- Procediment

1- Amb la pipeta estèril i el pipetejador automàtic s'introdueixen 1,5 ml del medi LB líquid en cada tub de vidre, prèviament retolats.

2- Amb la nansa s'agafen unes quantes colònies aïllades de cada placa i s'introdueixen en els tubs de vidre amb LB.

3- Amb un vòrtex es barregen els tubs perquè els bacteris entrin en contacte amb l'LB.

4- Finalment es deixen els tubs de vidre en gradetes a la incubador a 37°C durant tota la nit perquè els bacteris es divideixin. Els cultius que trobem el dia següent s'anomenen cultius de nit.



A2.4. Inoculació de soques a medi LB amb l'antibiòtic gentamicina

Per dur a terme l'assaig d'invasió, es necessita que les soques que utilitzem no siguin resistents a l'antibiòtic gentamicina. Per això prèviament s'havien de descartar les que ho eren.

- Material

Micropipeta amb puntes estèrils

44 soques d'*E. coli* en medi LB

Gradeta

Medi LB líquid estèril

44 Tubs de vidre estèril

Dissolució de gentamicina estèril al 10 mg/ml

- Procediment

1- Primer es prepara el medi LB amb gentamicina. La concentració de l'antibiòtic ha de ser de 0,1 mg/ml, però la de la dissolució estoc era de 10 mg/ml. Per tant, per a 1 ml d'LB s'hi han de posar 0,01 ml de la dissolució estoc de gentamicina.

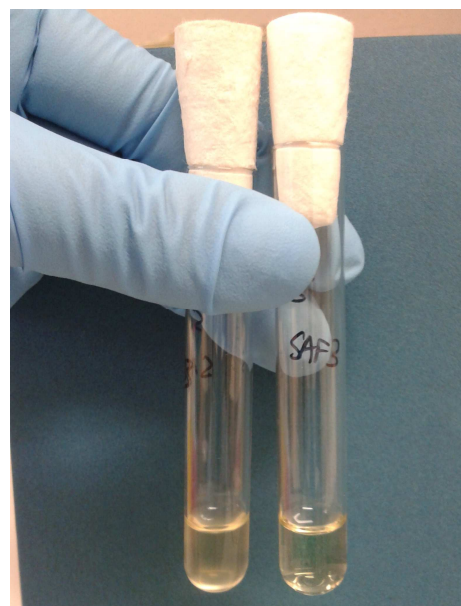
2- Amb la micropipeta hem posat 0,01 ml de gentamicina i 0,99 ml de medi LB líquid a cada tub estèril de la gradeta i hi hem inoculat les soques també amb la micropipeta (0,01 ml a cada tub)..

3- Es deixen les gradetes amb els tubs a la incubadora a 37°C tota la nit.

- Resultats i interpretació

El dia següent es realitza la lectura d'aquest test de resistència a la gentamicina:

- La majoria de tubs han quedat transparents. Significa que els aïllats són sensibles a la gentamicina i per tant no s'han pogut desenvolupar en l'LB.
- Alguns altres tubs han quedat tèrbols. Significa que els bacteris s'han multiplicat perquè són resistents a la gentamicina. Les soques d'aquests tubs es descarten perquè no serviran pels assajos.



A2.5. Preparació de glicerínats

Els glicerínats són els cultius d'*Escherichia coli* en medi líquid LB als quals hem afegit glicerol per a mantenir els bacteris en vida a molt baixa temperatura mesos o anys, fins que els vulguem utilitzar per a fer els experiments amb aquests cultius. A partir dels glicerínats a -80°C que tenim, n'hem fet una còpia per guardar a -20°C perquè si se'ns contaminen durant els assajos puguem recórrer als primers aïllats.

- Material

Micropipeta amb puntes estèrils

Gradeta

Tubs Eppendorf estèrils

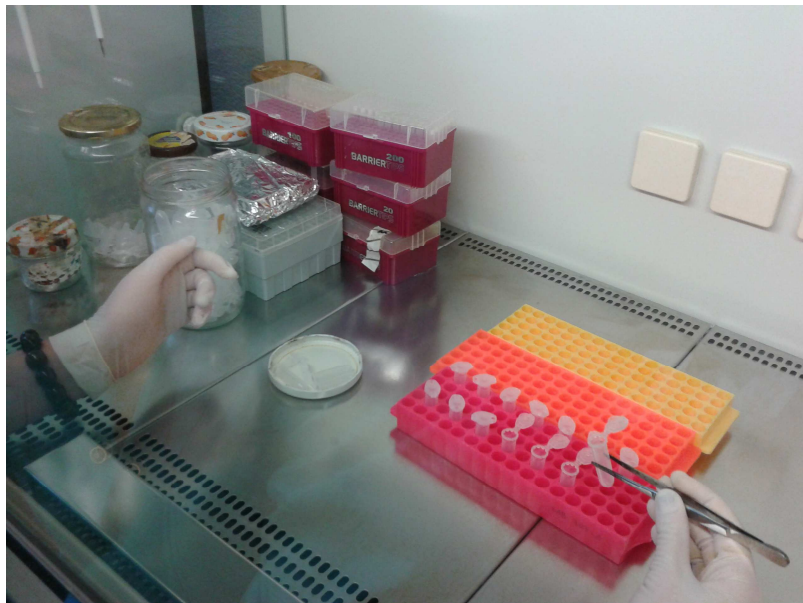
Retolador permanent

44 soques d'*E. coli* en medi líquid LB

Glicerol pur estèril

- Procediment

- 1- Introduir amb la micropipeta 250 μl del glicerol pur a cada tub estèril de la gradeta prèviament retolat amb el codi de la soca.
- 2- Inocular 1 ml del cultiu també amb la micropipeta.
- 3- Barrejar per inversió i congelar a -20°C .



A2.6. Preparació de cultius cel·lulars

- Material

Flascó estèril	Centrífuga i tubs de centrífuga
Pipetes estèrils	Incubadora
Pipetejador automàtic	Cultiu de cèl·lules intestinals I407 en medi EMEM suplementat en un flascó
Cambra de Neubauer	Solució PBS
Plaques multipouets	Dissolució amb tripsina
Microscopi	

- Procediment

- 1- Comprovar amb el microscopi que la confluència del cultiu cel·lular en el flascó és del 60 o 70%, és a dir, que més de la meitat de la superfície inferior del flascó està coberta de cèl·lules enganxades.
- 2- Es treu el medi EMEM del flascó amb una pipeta Pasteur per a deixar només les cèl·lules enganxades al flascó.
- 3- Es netegen les cèl·lules amb 5 ml de PBS per a acabar de treure els restes de cèl·lules mortes que hi queden amb una pipeta i un pipetejador automàtic. Amb una pipeta Pasteur es retira el PBS afegit.
- 4- També amb una pipeta i el pipetejador s'hi afegeix una dissolució amb tripsina perquè les cèl·lules vives, enganxades al flascó, es desenganxin i quedin lliures pel líquid.
- 5- S'hi afegeix medi EMEM i amb una pipeta i el pipetejador es posa la mescla de tripsina i EMEM amb cèl·lules en suspensió en un tub de centrífuga per a centrifugar-ho a 1500 rpm durant 5 minuts a 4°C.
- 6- Com que totes les cèl·lules queden a la part de baix del tub, per decantació es treu el medi i s'introdueixen en un altre flascó estèril.
- 7- En el flascó, es resuspenen les cèl·lules en medi EMEM pipetejant: s'afegeix medi amb una pipeta i el pipetejador i es barregen i separen les cèl·lules entre elles aspirant-les i deixant-les anar amb la pipeta diverses vegades.
- 8- Es quantifiquen les cèl·lules al microscopi utilitzant una cambra de Neubauer. Com que la concentració era més concentrada que la necessària, es dilueix afegint-hi medi EMEM fins arribar a les $4 \cdot 10^5$ cèl./ml.
- 9- Es dispensa 1 ml de la dissolució amb cèl·lules amb una pipeta i el pipetejador a cadascun dels 24 pouets de la placa, on es durà a terme la infecció dels assajos d'adhesió i invasió.
- 10- Finalment es deixen les cèl·lules en els pouets durant 20 h a la incubadora a 37°C

amb 5% de CO₂ perquè s'adhereixin completament al fons dels pouets, sense que els doni temps a multiplicar-se.



Annex-3:

Resultats i càlculs

A3.1. Proves X-glucorònid i gentamicina

Abans de treballar amb les soques congelades ens vam haver d'assegurar que eren d'*Escherichia coli* (havien de donar colònies blaves en el medi TBX, és a dir, en la prova de l'X-glucorònid) i que, a més, eren sensibles a la gentamicina. Els aïllats que no complien aquestes dues condicions els vam descartar de l'estudi. Els resultats d'aquestes proves es troben a les següents taules, classificats segons el grup de pacients de què provenien els aïllats.

Llegenda de les taules:

- (1) + = colònies blaves (són *E. coli*)
 - (+) = colònies blau clar (també són *E. coli*)
 - = colònies beix (no sabem si són o no *E. coli*)

- (2) + = hi ha colònies (resistents a la gentamicina)
 - = no hi ha colònies (sensibles a la gentamicina)

a) Pacients celíacs actius

Pacient	Edat (anys)	Codi dels aïllats	Prova X-glucorònid (1)	Prova gentamicina (2)
CAI	6,3	ENT CAI 1	+	-
		ENT CAI 5	+	-
CAK	2,3	ENT CAK 1	+	-
		ENT CAK 3	+	-
CAL	7,5	ENT CAL 2	(+)	-
		ENT CAL 5	(+)	-
CAP	1,5	ENT CAP 1	+	-
CBD	1	ENT CBD 1	+	-
		ENT CBD 10	+	-
CBE	3,7	ENT CBE 9	+	-
		ENT CBE 10	+	-
CBG	2,2	ENT CBG 3	+	-
CCI	(sense dades)	ENT CCI 1	+	-
CCM	8,8	ENT CCM 1	+	-

b) Pacients celíacs inactius

Pacient	Edat (anys)	Codi dels aïllats	Prova X-glucorònid (1)	Prova gentamicina (2)
CBJ	5	ENT CBJ 1	+	-
CBL	3,5	ENT CBL 2	+	-
CBM	9	ENT CBM 1	+	-
CBN	6	ENT CBN 1	+	-
		ENT CBN 8	+	-
CBU	1	ENT CBU 1	+	-
CCC	12,3	ENT CCC 1	+	-
		ENT CCC 4	+	-
CCD	4	ENT CCD 1	+	-
CCH	7,5	ENT CCH 1	+	-
		ENT CCH 3	+	-
CCJ	10,6	ENT CCJ 1	+	-
		ENT CCJ 3	-	+
		ENT CCJ 5	+	-

c) Pacients sans

Pacient	Edat (anys)	Codi dels aïllats	Prova X-glucorònid (1)	Prova gentamicina (2)
SR	(sense dades)	ENT SR 1	+	-
		ENT SR 2	+	-
SS	0,1	ENT SS 1	+	-
		ENT SS 2	+	-
ST	0,3	ENT ST 1	+	-
		ENT ST 5	+	-
CAY	2,6	ENT CAY 1	-	
CAJ	5,2	ENT CAJ 1	+	-
SAA	7	ENT SAA 2	+	+
SAB	4	ENT SAB 4	+	+
		ENT SAB 5	+	-
SAD	7	ENT SAD 1	+	-
		ENT SAD	+	+
SAF	0,6	ENT SAF 3	+	-
SAG	7,8	ENT SAG 1	contaminat	contaminat
		ENT SAG 5	+	-
SAH	0,6	ENT SAH 4	+	-

A3.2. Càlculs amb l'espectrofotòmetre

Per a infectar necessitàvem $1,6 \cdot 10^8$ bacteris/ml. Com que en cada cultiu de nit no hi havia el mateix nombre de bacteris, primer els vam haver de quantificar per a saber quants ml d'aquest cultiu havíem de posar per a assolir els $1,6 \cdot 10^8$ bacteris/ml. Aquests $1,6 \cdot 10^8$ bacteris/ml equivalen a 0,1 UA (Unitats d'Absorbància, també anomenades DO, de Densitat Òptica), que són les unitats amb què es mesura l'absorbància amb l'espectrofotòmetre.

Per començar vam diluir a la meitat les mostres a les quals vam mesurar l'absorbància: vam col·locar 0,5 ml de cultiu de nit i 0,5 ml d'LB estèril a cada cubeta. Tot seguit vam configurar la longitud d'ona de l'espectrofotòmetre a 620 nm, perquè és la que es necessita per a calcular l'absorbància, la vam calcular de cada cultiu.



Espectrofotòmetre

Font:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/1/10/Spektrofotometri.jpg/800px-Spektrofotometri.jpg>



Cubeta d'espectrofotòmetre

Font:

<http://www.jjimeno.com/434-294-thickbox/cubeta-espectrofotometro-45-ml-makro-pmma-brand.jpg>

Un cop mesurada l'absorbància, només calia fer alguns càlculs per a saber la quantitat que s'havia de posar de cada cultiu de nit a cada pouet per la infecció.

A la següent taula es mostra un exemple d'una mesura amb els càlculs corresponents:

A1: ENT CAI1	mesurat	DO *(1)	Vol. Bacteris (µl) *(2)	Vol. PBS (µl) *(3)
	782	1564	64	936

*(1) Com que les mostres mesurades estaven diluïdes a la meitat, l'absorbància mesurada s'haurà de multiplicar per 2 per a saber la real de cada mostra.

*(2) Com que els $1,6 \cdot 10^8$ bacteris/ml que volem equivalen a 0,1 UA:

$$0,1UA * \frac{1000 \mu l}{1564UA} = 64 \mu l$$

*(3) És $1000 - 64 = 936$ perquè en total posarem 1000 µl a cada pou.

A3.4. Resultats dels assaigs d'adhesió i invasió

a) Càlculs del banc de dilucions

Tenim una dissolució de la qual volem saber-ne el nombre de bacteris. Per a quantificar-la, com que si hi posem aquesta dissolució directa pot ser massa concentrada i no la podrem comptar, l'hem de diluir. Com que tampoc sabem les vegades que ho hem de diluir fins que quedi amb un nombre adequat per quantificar, fem diferents dilucions.

Per sembrar hem utilitzat la mostra directa sense fer dilucions i dilucions de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} . Per exemple, la 10^{-1} , significa que ha estat diluïda una vegada amb una proporció de mostra sobre Ringer de 1/10 (perquè hi hem posat 450 µl de Ringer i 50 µl de mostra), i $1/10=10^{-1}$.

De les tres sèmres de cada soca en cada assaig, en vam triar una en la qual el nombre de colònies estigués entre les 50 i les 150, i les vam comptar. Cada colònia prové d'una ufc (unitat formadora de colònia) i, generalment, cada bacteri sembrat n'és una.

Llavors, fent els càlculs corresponents (detallats a l'Annex-3) vam saber aproximadament el nombre total de bacteris que hi havia per a cada ml de solució de cada pou on s'havien realitzat els assajos.

Per exemple, si hi hem comptat 36 ufc en una dilució de 10^{-2} , utilitzant la fórmula:

$$\frac{\text{colònies o ufc}}{\text{volum sembrat} \cdot \text{dilució}}, \text{ el càlcul queda: } \frac{36 \text{ ufc}}{0,025 \text{ ml} \cdot 10^{-2}} = 14,4 \cdot 10^4 \frac{\text{ufc}}{\text{ml}_{\text{dsó_tritó}}}$$

Com que per infectar havíem posat 0,5 ml de Tritó X-100 enlloc d'1, aquest resultat s'ha de dividir entre dos, i queda $7,2 \cdot 10^4$, en la taula expressat 0,20E+04.

b) Càlcul dels índex d'adhesió i d'invasió

Per a calcular els índex d'invasió i adhesió, utilitzem les següents fórmules:

$$\text{ADH} = \frac{n^{\text{e}} \text{ bacteris}}{n^{\text{e}} \text{ cèl} \cdot \text{lules}} \quad \text{INV (\%)} = \frac{n^{\text{e}} \text{ bacteris (intracel} \cdot \text{lulars)}}{4 \cdot 10^6 \text{ bacteris inoculats}} \cdot 100$$

c) Càlcul de mitjanes aritmètiques

Com que teníem triplicats de cada soca per tal que el resultat fos més acurat, calia calcular la mitjana dels tres índex d'adhesió i dels tres d'invasió de cadascuna.

El càlcul de mitjana aritmètica es fa amb la següent fórmula, que significa fer el sumatori de tots els valors i dividir-ho pel nombre de valors que hi hagi:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{n}$$

d) Càlcul de desviacions típiques

La desviació típica o desviació estàndard és una mesura de dispersió, que ens informa de la distància de les dades respecte la mitjana aritmètica per tal de descriure i interpretar millor els resultats. Es calcula a partir de la següent fórmula, que significa fer l'arrel quadrada del sumatori del quadrat de la diferència entre cada valor i la mitjana, dividit entre el nombre de valors que hi hagi menys una unitat):

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

e) Taules dels resultats amb els càlculs

Els resultats dels assaigs amb els càlculs explicats en els subapartats anteriors es troben recollits en les següents taules (en vermell, els índex d'adhesió superiors a 1 i els d'invasió superiors a 0,1).

- Aïllats controls

SOCA	DILUCIONS					ADHESIÓ	INVASIÓ	ADH_I	INV_I	MITJ ADH	DESV ADH	MITJ INV	DESV INV	
	10-2	10-3	10-4	D	10-1									
AIEC LF82			64			53	1,28E+07	1,06E+05	32,00	2,650	19,46	11,23	2,475	1,407
AIEC LF82			32			56	6,40E+06	1,12E+05	16,00	2,800				
AIEC LF82		85				40	1,70E+06	8,00E+04	4,25	2,000				
AIEC LF82			29			83	5,80E+06	1,66E+05	14,50	4,150				
AIEC LF82			33			65	6,60E+06	1,30E+05	16,50	3,250				
AIEC LF82			67			28	1,34E+07	5,60E+04	33,5	0,000				
NON PAT C600		55		14			1,10E+06	2,80E+02	2,75	0,007	3,30	1,61	0,003	0,002
NON PAT C600		82		0			1,64E+06	0,00E+00	4,1	0,000				
NON PAT C600		68		5			1,36E+06	1,00E+02	3,40	0,003				
NON PAT C600			12	7			2,40E+06	1,40E+02	6,00	0,004				
NON PAT C600		31		4			6,20E+05	8,00E+01	1,55	0,002				
NON PAT C600		40		8			8,00E+05	1,60E+02	2,00	0,004				

- Pacients celíacs actius

SOCA	DILUCIONS						ADHESIÓ	INVASIÓ	ADH_I	INV_I	MITJ ADH	DESV ADH	MITJ INV	DESV INV
	10- 2	10- 3	10- 4	D	10- 1	10- 2								
ENT CAI 1			21		13		4,20E+06	2,60E+03	10,50	0,065	9,17	1,74	0,050	0,031
ENT CAI 1		196		142			3,92E+06	2,84E+03	9,80	0,071				
ENT CAI 1		144		30			2,88E+06	6,00E+02	7,2	0,015				
ENT CAI 5			19	46			3,80E+06	9,20E+02	9,50	0,023	10,22	7,45	0,030	0,027
ENT CAI 5			36		12		7,20E+06	2,40E+03	18,00	0,060				
ENT CAI 5		63		14			1,26E+06	2,80E+02	3,2	0,007				
ENT CAK 1		16		45			3,20E+05	9,00E+02	0,80	0,023	0,73	0,70	0,018	0,006
ENT CAK 1	0			39			0,00E+00	7,80E+02	0,00	0,020				
ENT CAK 1		28		22			5,60E+05	4,40E+02	1,4	0,011				
ENT CAK 3		33		67			6,60E+05	1,34E+03	1,65	0,034	0,84	0,06	0,023	0,010
ENT CAK 3		16		36			3,20E+05	7,20E+02	0,80	0,018				
ENT CAK 3	176			32			3,52E+05	6,40E+02	0,9	0,016				
ENT CAL 2		56		182			1,12E+06	3,64E+03	2,80	0,091	2,90	0,14	0,070	0,027
ENT CAL 2		60			16		1,20E+06	3,20E+03	3,00	0,080				
ENT CAL 2		14		73	13		2,80E+05	1,56E+03	0,7	0,039				
ENT CAL 5	10			3			2,00E+04	6,00E+01	0,05	0,002	0,61	0,97	0,002	0,001
ENT CAL 5	29	9		2			6,91E+05	4,00E+01	1,73	0,001				
ENT CAL 5	12			3			2,40E+04	6,00E+01	0,1	0,002				
ENT CAP 1	50			29			1,00E+05	5,80E+02	0,25	0,015	0,52	0,28	0,012	0,007
ENT CAP 1		16		33			3,20E+05	6,60E+02	0,80	0,017				
ENT CAP 1	103			8			2,06E+05	1,60E+02	0,5	0,004				
ENT CBD 1	40			32			8,00E+04	6,40E+02	0,20	0,016	0,24	0,14	0,025	0,018
ENT CBD 1	80				9		1,60E+05	1,80E+03	0,40	0,045				
ENT CBD 1	25			26			5,00E+04	5,20E+02	0,1	0,013				
ENT CBD 10		11		35			2,20E+05	7,00E+02	0,55	0,018	0,38	0,29	0,022	0,011
ENT CBD 10	110			68			2,20E+05	1,36E+03	0,55	0,034				
ENT CBD 10	10			27			2,00E+04	5,40E+02	0,1	0,014				
ENT CBE 10		22		65			4,40E+05	1,30E+03	1,10	0,033	0,12	0,09	0,004	0,000
ENT CBE 10	36			7			7,20E+04	1,40E+02	0,2	0,004				
ENT CBE 10	10			7			2,00E+04	1,40E+02	0,1	0,004				
ENT CBE 9			33		16		6,60E+06	3,20E+03	16,50	0,080	0,64	0,37	0,016	0,022
ENT CBE 9	74			1			1,48E+05	2,00E+01	0,37	0,001				
ENT CBE 9		18		64			3,60E+05	1,28E+03	0,90	0,032				
ENT CBG 3	18			23			3,60E+04	4,60E+02	0,09	0,012	0,09	0,01	0,039	0,027
ENT CBG 3	20				13		4,00E+04	2,60E+03	0,10	0,065				
ENT CBG 3	17			77	8		3,40E+04	1,55E+03	0,1	0,039				
ENT CCI 1		23		52			4,60E+05	1,04E+03	1,15	0,026	1,18	0,04	0,026	0,000
ENT CCI 1		24		51			4,80E+05	1,02E+03	1,20	0,026				
ENT CCI 1		12		52			2,40E+05	1,04E+03	0,6	0,026				
ENT CCM 1		28		166			5,60E+05	3,32E+03	1,40	0,083	1,40	0,00	0,066	0,024
ENT CCM 1		28		97			5,60E+05	1,94E+03	1,40	0,049				
ENT CCM 1		107		55			2,14E+06	1,10E+03	5,4	0,028				

- Pacients celíacs inactius

SOCA	DILUCIONS						ADHESIÓ	INVASIÓ	ADH_I	INV_I	MITJ	DESV	MITJ	DESV
	10-2	10-3	10-4	D	10-1	10-2					ADH	ADH	INV	INV
ENT CBJ 1		41		12			8,20E+05	2,40E+02	2,05	0,006	2,62	0,39	0,008	0,006
ENT CBJ 1		30		30			6,00E+05	6,00E+02	1,50	0,015				
ENT CBJ 1		86		8			1,72E+06	1,60E+02	4,3	0,004				
ENT CBL 2		147		3			2,94E+06	6,00E+01	7,35	0,002	1,13	0,25	0,002	0,000
ENT CBL 2		19		4			3,80E+05	8,00E+01	0,95	0,002				
ENT CBL 2		26		4			5,20E+05	8,00E+01	1,3	0,002				
ENT CBM 1	108			62			2,16E+05	1,24E+03	0,54	0,031	1,68	0,18	0,040	0,019
ENT CBM 1		31		124			6,20E+05	2,48E+03	1,55	0,062				
ENT CBM 1		36		56	7		7,20E+05	1,12E+03	1,8	0,028				
ENT CBN 1	74			29			1,48E+05	5,80E+02	0,37	0,015	0,40	0,10	0,020	0,013
ENT CBN 1	63			68			1,26E+05	1,36E+03	0,32	0,034				
ENT CBN 1	103			20			2,06E+05	4,00E+02	0,5	0,010				
ENT CBN 8	86			16			1,72E+05	3,20E+02	0,43	0,008	0,46	0,07	0,012	0,005
ENT CBN 8	109			34			2,18E+05	6,80E+02	0,55	0,017				
ENT CBN 8	82			22			1,64E+05	4,40E+02	0,4	0,011				
ENT CCC 1	13			12			2,60E+04	2,40E+02	0,07	0,006	0,12	0,05	0,007	0,005
ENT CCC 1	27			24			5,40E+04	4,80E+02	0,14	0,012				
ENT CCC 1	33			5			6,60E+04	1,00E+02	0,2	0,003				
ENT CCC 4	21			18			4,20E+04	3,60E+02	0,11	0,009	0,13	0,02	0,007	0,004
ENT CCC 4	30			20			6,00E+04	4,00E+02	0,15	0,010				
ENT CCC 4	28			3			5,60E+04	6,00E+01	0,1	0,002				
ENT CCD 1	67	13		20			1,45E+06	4,00E+02	3,64	0,010	2,53	1,01	0,047	0,063
ENT CCD 1		33			24		6,60E+05	4,80E+03	1,65	0,120				
ENT CCD 1		46		22			9,20E+05	4,40E+02	2,3	0,011				
ENT CCH 1	85			7			1,70E+05	1,40E+02	0,43	0,004	0,30	0,16	0,002	0,002
ENT CCH 1	23			3			4,60E+04	6,00E+01	0,12	0,002				
ENT CCH 1	73			0			1,46E+05	0,00E+00	0,4	0,000				
ENT CCH 3	86			3			1,72E+05	6,00E+01	0,43	0,002	0,48	0,06	0,003	0,002
ENT CCH 3	25			10			5,00E+04	2,00E+02	0,13	0,005				
ENT CCH 3	104			2			2,08E+05	4,00E+01	0,5	0,001				
ENT CCJ 1	61			0			1,22E+05	0,00E+00	0,31	0,000	0,14	0,14	0,000	0,000
ENT CCJ 1	10			0			2,00E+04	0,00E+00	0,05	0,000				
ENT CCJ 1	14			0			2,80E+04	0,00E+00	0,1	0,000				
ENT CCJ 5	56			3			1,12E+05	6,00E+01	0,28	0,002	0,15	0,11	0,001	0,001
ENT CCJ 5	19			1			3,80E+04	2,00E+01	0,10	0,001				
ENT CCJ 5	16			0			3,20E+04	0,00E+00	0,1	0,000				

- Pacients sans

SOCA	DILUCIONS						ADHESIÓ	INVASIÓ	ADH_I	INV_I	MITJ ADH	DESV ADH	MITJ INV	DESV INV
	10- 2	10- 3	10- 4	D	10- 1	10- 2								
ENT CAJ 1			10		800		2,00E+06	1,60E+05	5,00	4,000	3,375	2,298	4,275	0,389
ENT CAJ 1	20			63	13		4,00E+04	1,38E+03	0,10	0,035				
ENT CAJ 1		35				91	7,00E+05	1,82E+05	1,75	4,550				
ENT SAB 5		16		72			3,20E+05	1,44E+03	0,80	0,036	0,06	0,07	0,023	0,019
ENT SAB 5	2			3			4,00E+03	6,00E+01	0,01	0,002				
ENT SAB 5	22			63			4,40E+04	1,26E+03	0,1	0,032				
ENT SAD 1	9			6			1,80E+04	1,20E+02	0,05	0,003	0,07	0,02	0,016	0,012
ENT SAD 1	16			55			3,20E+04	1,10E+03	0,08	0,028				
ENT SAD 1	18			35			3,60E+04	7,00E+02	0,1	0,018				
ENT SAF 3	43			7			8,60E+04	1,40E+02	0,22	0,004	1,19	1,33	0,900	0,141
ENT SAF 3		13			160		2,60E+05	3,20E+04	0,65	0,800				
ENT SAF 3		54		2000			1,08E+06	4,00E+04	2,7	1,000				
ENT SAG 5	17			3			3,40E+04	6,00E+01	0,09	0,002	0,04	0,04	0,001	0,000
ENT SAG 5	2,8			2			5,60E+03	4,00E+01	0,01	0,001				
ENT SAG 5	4			1			8,00E+03	2,00E+01	0,0	0,001				
ENT SAH 4		49		10			9,80E+05	2,00E+02	2,45	0,005	1,42	1,16	0,007	0,003
ENT SAH 4	33				2		6,60E+04	4,00E+02	0,17	0,010				
ENT SAH 4		33		10			6,60E+05	2,00E+02	1,7	0,005				
ENT SR 1	64			4			1,28E+05	8,00E+01	0,32	0,002	0,17	0,21	0,002	0,000
ENT SR 1	5			5			1,00E+04	1,00E+02	0,03	0,003				
ENT SR 2	96			24			1,92E+05	4,80E+02	0,48	0,012	0,40	0,12	0,012	0,000
ENT SR 2	63			25			1,26E+05	5,00E+02	0,32	0,013				
ENT SS 1		21		13			4,20E+05	2,60E+02	1,05	0,007	0,59	0,44	0,010	0,006
ENT SS 1	106			13			2,12E+05	2,60E+02	0,53	0,007				
ENT SS 1	36			35			7,20E+04	7,00E+02	0,18	0,018				
ENT SS 2		24		13			4,80E+05	2,60E+02	1,20	0,007	1,05	0,35	0,006	0,004
ENT SS 2		13		4			2,60E+05	8,00E+01	0,65	0,002				
ENT SS 2		26		18			5,20E+05	3,60E+02	1,3	0,009				
ENT ST 1	41			5			8,20E+04	1,00E+02	0,21	0,003	0,13	0,11	0,003	0,001
ENT ST 1	9			8			1,80E+04	1,60E+02	0,05	0,004				
ENT ST 5	7			0			1,40E+04	0,00E+00	0,04	0,000	0,05	0,01	0,001	0,001
ENT ST 5	11			3			2,20E+04	6,00E+01	0,06	0,002				