

NOTA TÉCNICA

## Cultivos primarios de células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano: un modelo biológico para el estudio de los mecanismos de infección por enterococos

Carlos Andrés Chiriboga <sup>1</sup>, Marta Raquel Fontanilla <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Universidad El Bosque; programa de posgrado interfacultades de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Instituto de Biología Molecular, Universidad El Bosque; Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

Aunque las especies de enterococos son flora normal del tracto gastrointestinal humano, se encuentran entre los tres agentes patógenos microbianos que más se asocian con infecciones intrahospitalarias. Tradicionalmente, los enterococos se han considerado bacterias extracelulares. Sin embargo, es creciente la información que reporta su ingreso a través de líneas celulares epiteliales o macrófagos. A pesar de que estos microorganismos constituyen el tercer grupo de aislamientos obtenido de pacientes con bacteriemia o endocarditis, su interacción con la célula endotelial no se ha descrito completamente. En el presente trabajo evaluamos si el aislamiento intrahospitalario de *Enterococcus faecalis* (Ef2880) podía penetrar en células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) cultivadas *in vitro*. Nuestros resultados indican que los cultivos primarios HUVEC después de ser inoculados con Ef2890, incubados y tratados con antibióticos bactericidas para las bacterias extracelulares y adheridas a la cara externa de la membrana celular, exhiben bacterias intracelulares que pueden ser recuperadas vivas cuatro horas después de la inoculación. El modelo biológico desarrollado se puede constituir en una herramienta útil para el estudio de las interacciones que establecen los enterococos con el endotelio.

**Palabras clave:** endotelio, cultivo celular, *Enterococcus* sp., infección enterocócica de cultivos de HUVEC

### Primary cultures of human umbilical chord vein endothelial cells: a biological model for studying enterococcal infection mechanisms

Although enterococcus bacteria are normal human intestinal flora, they rank as the third most common pathogen involved in hospital acquired infections. Generally, these bacteria are considered extracellular pathogens; however, an increasing number of reports indicate invasiveness to epithelial cell lines and macrophages. Despite their importance as nosocomial infection agents in patients suffering bacteremias and endocarditis, their interaction with endothelial cells has not been fully described. Herein, the nosocomial *Enterococcus faecalis* isolate Ef2890 from a hospitalized patient was exposed to cultured human venous endothelial cells from the umbilical chord. When the primary cell cultures were inoculated with Ef2890 and treated with bactericidal antibiotics to kill extracellular and adhered bacteria, intracellular bacteria were recovered and plated 4 h post-infection. These observations indicate that cell cultures provide a valuable biological model to study interactions between endothelium and enterococci.

**Key words:** *Enterococcus* sp., endothelium, cell culture, enterococcal infection, nosocomial infections.

Los enterococos son parte de la flora normal del tracto gastrointestinal humano. Sin embargo, las bacterias de este género son aislamientos de nosocomios, principalmente de pacientes con endocarditis, bacteriemias e infecciones urinarias (1-3). Lo anterior se ve agravado por el incremento, incluso en Colombia, del número de aislamientos resistentes a los antibióticos comúnmente empleados en el tratamiento de estas infecciones (4,5).

La endocarditis infecciosa es una patología del endotelio que afecta generalmente las válvulas normales, protésicas o patológicas del corazón (6). La lesión característica, denominada "vegetación", es una biopelícula que se forma cuando las bacterias circulantes se adhieren al endotelio lesionado y son cubiertas por una capa de plaquetas y fibrina. El microambiente proporcionado por la biopelícula esconde el microorganismo, y le permite evitar la acción defensiva del sistema inmune y sobrevivir (6).

Los estudios con bacterias Gram negativas y Gram positivas han mostrado su efecto regulador o de sus productos sobre la expresión por parte de las células endoteliales de moléculas de adhesión, factores de crecimiento y citocinas endoteliales en las infecciones sistémicas (7-11). Sin embargo, la investigación sobre los procesos de penetración de cepas de enterococos en células endoteliales no está muy desarrollada, en parte, porque estos organismos se consideran flora normal (3).

La emergencia de enterococos con niveles importantes de resistencia a los antibióticos ha hecho que aumente el interés por entender los mecanismos que estas bacterias usan para lesionar los tejidos de los sitios que colonizan. Ya se ha demostrado que las cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes a los antibióticos son capaces de trasladarse a través del epitelio intestinal de ratones (12,13) y los estudios sobre los factores bacterianos

involucrados en las interacciones célula-patógeno han identificado sustancias que desempeñan un papel importante en el ingreso de la bacteria en enterocitos y macrófagos cultivados (14-16). Como se cree que muchas infecciones enterocócicas del torrente sanguíneo tienen origen entérico (17), los estudios *in vitro* se han enfocado a entender los mecanismos empleados por los enterococos para superar la barrera epitelial y sobrevivir en los macrófagos. Recientemente, se reportó que los aislamientos nosocomiales de *E. faecalis* se adhieren e invaden células HeLa y que la endocitosis mediada por receptores puede ser uno de los mecanismos utilizados por la bacteria para invadir este tipo de célula epitelial (17).

A pesar de que en las vegetaciones características de la endocarditis los enterococos interactúan estrechamente con las células endoteliales, *in vitro* no se ha estudiado la relación que establecen las diferentes especies enterocócicas con las células endoteliales. Tampoco, si estas células en cultivo introducen enterococos ni el papel que este proceso puede jugar en la recurrencia de la infección.

El propósito de este trabajo fue establecer si un aislamiento intrahospitalario de enterococo, inoculado en cultivos primarios de células endoteliales aisladas de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) es capaz de invadir las células endoteliales. Con este fin, estandarizamos los procedimientos que se deben seguir para infectar cultivos HUVEC con aislamientos nosocomiales de *E. faecalis*. Encontramos que al exponer las células a las bacterias por dos horas y luego tratarlas con antibióticos para eliminar *E. faecalis* extracelulares o adheridos a la membrana, es posible encontrar bacterias en el interior de las HUVEC cultivadas.

## Materiales y métodos

### ***Aislamientos bacterianos y sus condiciones de cultivo***

Para este trabajo se utilizó el aislamiento clínico *E. faecalis* Ef 2890. La caracterización y los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de este

Correspondencia:

Marta Raquel Fontanilla, Calle 52 B No 4-34, email: mrfontani@yahoo.com

Recibido: 01/06/04; aceptado: 13/09/04

aislamiento se describieron previamente por el Instituto de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque (4). La cepa no invasiva *Escherichia coli* DH5a sirvió como control negativo en los experimentos de infección. Las bacterias se mantuvieron y crecieron en caldo o agar infusión cerebro-corazón (BHI) (Biomedics, Madrid, España). Para preparar los inóculos utilizados en la infección, se inocularon suspensiones de los aislamientos en agar BHI y se incubaron a 35°C por 24 horas. Luego de la incubación, se resuspendieron 4 o 5 colonias en 20 ml de caldo BHI y se incubaron a 35°C por 18 horas con agitación constante a 150 rpm en un baño de María (Shaker Bath, Lab-line, USA). Posteriormente, se tomó 1 ml de este cultivo, se resuspendió en 9 ml de medio RPMI (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY) y se incubó hasta alcanzar una OD<sub>625</sub> de 0,08 a 0,1, equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, aproximadamente. Los cultivos así obtenidos se utilizaron como inóculos en los ensayos de invasión.

#### **Aislamiento y cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana**

Las células endoteliales de vena umbilical humana se obtuvieron siguiendo el protocolo establecido por Beekhuizen *et al.* (7) con algunas modificaciones introducidas por nosotros. Después de obtener el consentimiento informado firmado por las pacientes, se tomaron segmentos de cordón umbilical de 15 cm, aproximadamente, obtenidos de partos normales en el Servicio de Obstetricia de la Clínica El Bosque. Los segmentos de cordón se transportaron en solución tampón salina de fosfatos (PBS, pH 7,4) con suplemento de penicilina/estreptomicina (100 UI-100mg) (GIBCO), se lavaron y se desinfectaron externamente con etanol al 70%.

En los cordones limpios y desinfectados, se localizaron y canularon ambos extremos de la vena umbilical con aguja roma 21 fr y se fijaron las agujas con pinzas de Kelly. La vena umbilical se lavó con PBS para eliminar rastros de sangre, se llenó con una solución de tripsina-EDTA (0,25%/0,02% p/v) (GIBCO) y se incubó por 15 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, las células endoteliales fueron desprendidas lavando la vena con 10 ml, aproximadamente, de medio DMEM (GIBCO) con

suplemento de 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO). La suspensión celular obtenida se centrifugó a 1.800g por 10 minutos; el sedimento se resuspendió en medio DMEM con suplemento al 20% de SFB, penicilina-estreptomicina (100 UI-100mg), vitaminas (ICN, Biomedicals Inc.), aminoácidos no esenciales (GIBCO, Life Technologies) y piruvato de sodio al 1% (GIBCO, Life Technologies).

La cantidad de células viables presentes en la suspensión celular obtenida se determinó con una tinción vital (azul de tripano) y se escogieron suspensiones con viabilidades superiores al 80% para realizar las siembras. El inóculo empleado por frasco T de 12,5 cm<sup>2</sup> (Falcon) fueron las células endoteliales aisladas de venas umbilicales de tres segmentos de 10 cm. Los cultivos se incubaron en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> y temperatura de 37°C hasta observar confluencia. Para los ensayos de invasión, se utilizaron cultivos de segundo pasaje.

#### **Caracterización de los cultivos HUVEC primarios mediante detección inmunohistoquímica de la expresión del factor von Willebrand**

La expresión del factor VIII de la coagulación, factor von Willebrand (vW), en los cultivos HUVEC se detectó utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal de ratón anti-vW humano en dilución 1:25 (Dako, Dinamarca) y como anticuerpo secundario, un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón, conjugado con peroxidasa (Dako, Dinamarca) en dilución 1:100. Para la inmunotinción, se fijó el cultivo con metanol por 5 minutos y la placa sembrada se sometió a la siguiente serie descendente de baños con etanol para deshidratarla: 100% por 15 minutos, 95% por 10 minutos y 70% por 5 minutos. Después de lavar con PBS por 10 minutos, se bloqueó con gelatina al 1% por 1 hora, se volvió a lavar con PBS, se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 minutos y se lavó con PBS. Se agregó el anticuerpo *mouse anti-human von Willebrand factor*, se incubó por una hora y se lavó varias veces con PBS. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario *peroxidase conjugated goat anti-mouse immunoglobulin* por 30 minutos, se lavó con PBS y se incubó con el sustrato de la enzima por 5 minutos. Como tinción de contraste

se empleó hematoxilina. Para controlar la especificidad de la tinción se incluyeron dos controles: un cultivo de células HUVEC al que no se le adicionó anticuerpo primario y un cultivo de fibroblastos, que no expresan el factor, con anticuerpos primario y secundario.

#### **Ensayos de detección de *E. faecalis* intracelular en células HUVEC**

El ensayo utilizado para la detección intracelular de *E. faecalis* se adaptó del procedimiento seguido en los experimentos de protección a antibióticos (10,11). Se incubaron frascos T de 12,5 cm<sup>2</sup> con cultivos HUVEC confluentes con tripsina 0,25% por 20 minutos a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Se adicionó DMEM con suplemento de SFB al 10% para neutralizar la enzima; se centrifugó y el sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de medio DMEM con suplemento de SFB al 20% y se sembró en platos de cultivo de 24 pozos (Falcon), utilizando una densidad de siembra de 5 x 10<sup>4</sup> células por pozo. Los cultivos se incubaron por 24 horas o hasta alcanzar confluencia; luego, se lavaron tres veces con PBS; se adicionó medio RPMI sin suplemento y se incubaron por 3 horas en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido este tiempo, se agregó el inóculo bacteriano en medio RPMI a los pozos, utilizando una multiplicidad de infección de 2.000 bacterias por célula endotelial; se incubaron por 2 horas; se retiró el medio y las células se lavaron tres veces con PBS. Luego, se adicionó medio RPMI con suplemento de gentamicina-penicilina (500 mg-500 UI) y se incubaron por 2 horas (5% de CO<sub>2</sub> y temperatura de 37°C) con el fin de matar las bacterias extracelulares y las adheridas a la cara externa de la membrana celular. Después de transcurrido tiempo, los cultivos se lavaron con PBS, se lisaron con una solución de Tritón X-100 al 1% (Sigma) y se realizaron diluciones seriadas del lisado que se sembraron por extensión en cajas de agar BHI, se incubaron y se realizó el conteo de UFC.

Paralelamente, se llevó a cabo un experimento en el cual la infección se hizo con *E. coli* DH5a, y se incluyó como control negativo. Los datos se presentan como porcentaje de invasión = 100 x

(UFC recuperadas/UFC del inóculo inicial). Para comprobar la muerte de las bacterias extracelulares se sembraron 50 µl del sobrenadante de los cultivos tratados con la mezcla de antibióticos, se incubaron y se observaron para establecer la aparición de UFC en el agar.

#### **Microscopia óptica de la invasión de *E. faecalis* a células HUVEC**

Se hicieron pasajes de células HUVEC de cultivos confluentes en frascos T 12,5 a láminas de vidrio estériles con una densidad de 2 x 10<sup>4</sup> células por lámina y se incubaron en ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub> y temperatura de 37°C por 24 horas. Después de la incubación, se lavaron tres veces con PBS, se agregó medio RPMI sin suplemento y se incubaron por 3 horas en las mismas condiciones; se adicionó el inóculo bacteriano en medio RPMI con una multiplicidad de infección de 2.000 y se incubaron por 2 horas. Después de la incubación, se retiró el medio, se lavaron tres veces las células con PBS, se adicionó medio RPMI con suplemento de gentamicina-penicilina (500 mg-500 UI) y se incubó por 2 horas en 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

En este experimento se incluyeron cultivos infectados con la cepa de *E. coli* DH5a, como control negativo de la infección. Las láminas con los cultivos infectados se fijaron en metanol absoluto (Merck), se tiñeron con Gram o Giemsa y se observaron al microscopio.

#### **Microscopia electrónica de la invasión de *E. faecalis* a células HUVEC**

Se prepararon e infectaron cultivos en láminas de vidrio estériles de la forma descrita en los ensayos de microscopia óptica. Los cultivos infectados se fijaron en glutaraldehído al 3% en PBS (v/v) (Eufar), y se posfijaron con tetróxido de osmio; se sometieron a deshidratación en series ascendentes de etanol, embebidos en Epón, cortados finamente con un ultramicrotomo (LKB-Pharmacia), teñidos con una solución acuosa saturada de acetato de uranilo y citrato de plomo.

Las observaciones de los cortes se hicieron en un microscopio electrónico Phillips CM10 a 21.000 y 28.500 aumentos.

## Resultados

### **Aislamiento y cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)**

En este trabajo encontramos que la digestión enzimática con tripsina de la lámina endotelial que recubre la vena del cordón umbilical humano y la agrupación de los productos digeridos provenientes de tres cordones umbilicales cada uno con longitudes aproximadas de 15 cm permiten establecer cultivos primarios HUVEC. En este paso, no se establece el número exacto de células endoteliales aisladas y sembradas por frasco T-25 debido a que se obtienen muchos agregados celulares lo cual hace muy inexacto el conteo. Establecido el cultivo, los subcultivos se hacen con densidades celulares de  $5 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ .

En el panel A de la figura 1 se muestra un cultivo incubado por una semana, en el que se destaca la presencia de células con morfología poliédrica semejante a la reportada para el endotelio (18). El panel B corresponde a un cultivo con el mismo tiempo de incubación que fue sometido a tinción inmunohistoquímica para detectar la expresión del factor von Willebrand.

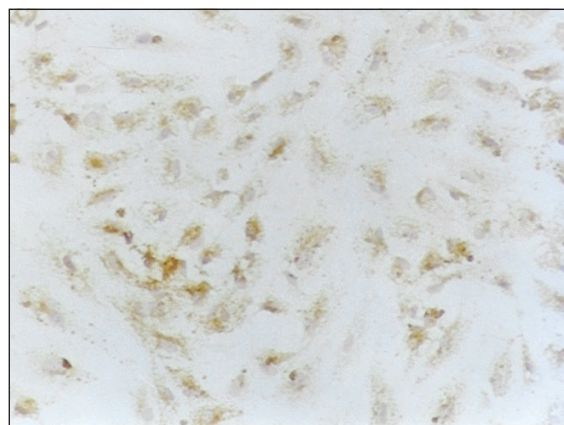
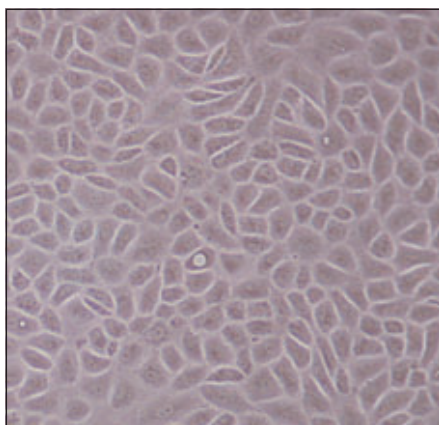
### **Interacción de las células HUVEC con *Enterococcus faecalis***

La presencia de bacterias viables dentro de las células endoteliales se estableció mediante un

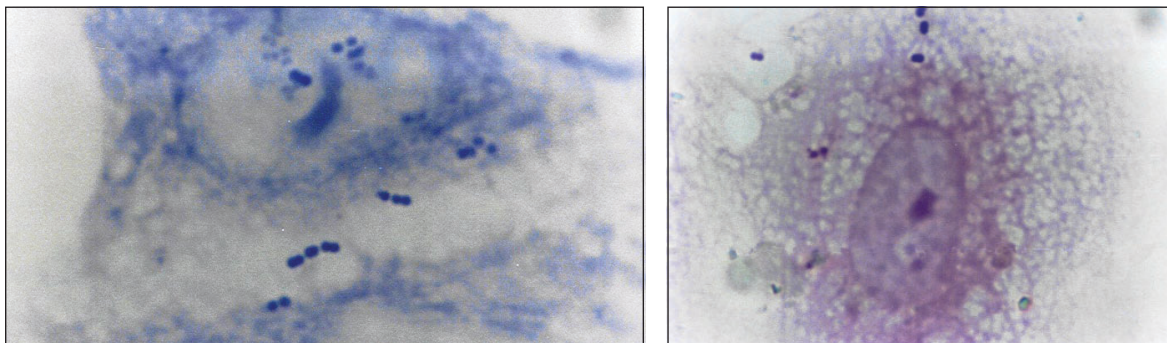
ensayo de protección a antibióticos. En éstos, después de infectar los cultivos con los aislamientos por dos horas, se adicionó una mezcla antibiótica de gentamicina y penicilina para matar las bacterias extracelulares, cuya muerte se comprobó mediante la siembra del sobrenadante. Los tiempos de infección y el tamaño del inóculo utilizados se determinaron en experimentos preliminares. Se escogió en 2 horas el tiempo de incubación con las bacterias, debido a la excesiva acidificación del medio de cultivo observada después de las 4 horas. Se observó la presencia de UFC en el sembrado obtenido a partir del lisado celular luego de 2 horas de incubación en medio sin suplemento y 2 horas más en medio con suplemento con concentraciones bactericidas de gentamicina- penicilina. Los resultados de los conteos de UFC, expresados como porcentajes de invasión, fueron de 0,18% para el aislamiento enterocócico Ef 2890 y de 0% para la cepa de *E. coli* DH5a, usada como control negativo de la invasión.

### **Ensayos con microscopía de luz**

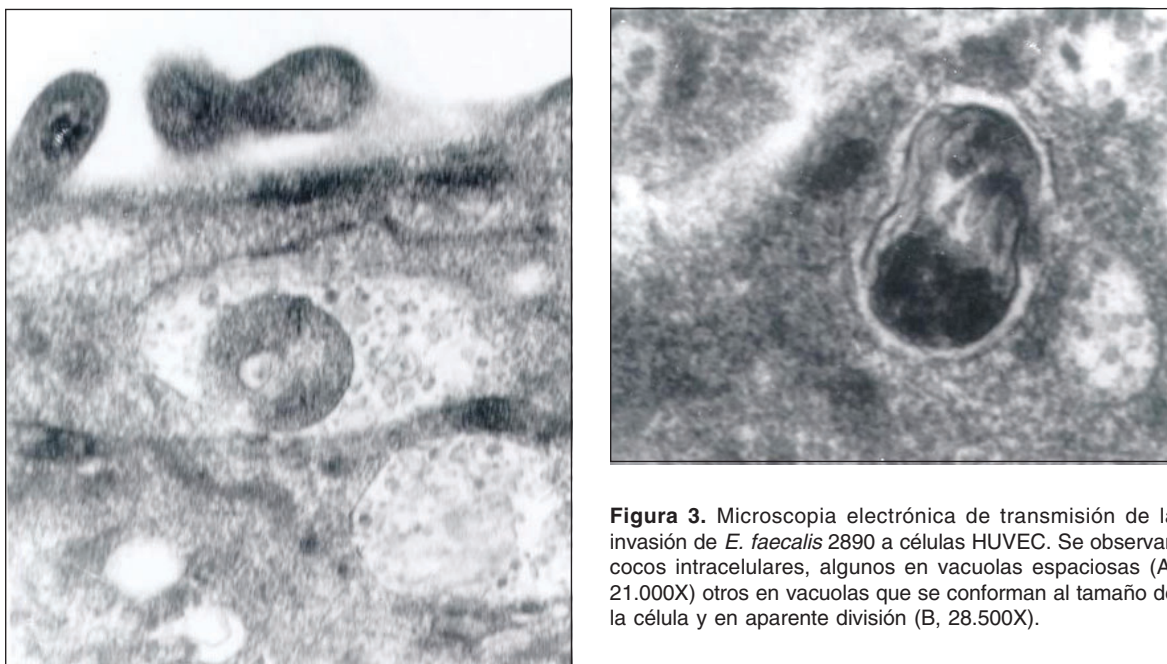
El panel A de la figura 2 presenta cultivos endoteliales infectados con *E. faecalis* Ef 2890 teñidos con la coloración de Gram; el panel B, los cultivos sometidos a la tinción de Giemsa. En todos los casos se evidenció la asociación de los enterococos con las células HUVEC. Los



**Figura 1.** Cultivos confluentes de células HUVEC. **A.** Microscopía con contraste de fase; se observan células con uniones estrechas y morfología poliédrica que exhiben una organización en "empedrado". **B.** Tinción inmunohistoquímica positiva para la expresión de factor de von Willebrand.



**Figura 2.** Microscopia óptica de la invasión de *E. faecalis* 2890 a células HUVEC. Los cultivos infectados se tiñeron con (A) Giemsa y (B) Gram y se observaron al microscopio. Las flechas señalan múltiples bacterias intracelulares (de acuerdo con los resultados del ensayo de protección a antibióticos), algunas en cadenas. *E. faecalis* 2890, 100X.



**Figura 3.** Microscopia electrónica de transmisión de la invasión de *E. faecalis* 2890 a células HUVEC. Se observan cocos intracelulares, algunos en vacuolas espaciosas (A, 21.000X) otros en vacuolas que se conforman al tamaño de la célula y en aparente división (B, 28.500X).

resultados de los tres experimentos realizados por triplicado indican que el aislamiento de *E. faecalis* Ef 2890 se asoció con 69,23% de las células endoteliales, mientras que la cepa de *E. coli* no estableció interacciones con éstas.

#### **Ensayos con microscopía electrónica de transmisión**

La microscopía electrónica de transmisión de células HUVEC inoculadas con *E. faecalis* 2890 (figura 3) muestra cocos intracelulares, algunos en vacuolas espaciosas (A) otros en vacuolas

ajustadas al tamaño de la célula (B). En algunos casos se observan bacterias en división (B) y formando tabiques.

#### **Discusión**

La investigación detallada de la interacción que establecen las bacterias de la especie *E. faecalis* con las células endoteliales se ve favorecida por la posibilidad de establecer cultivos primarios con células endoteliales provenientes de la vena del cordón umbilical humano. Éstos, al formar una monocapa uniforme, proveen un buen sustrato para

el estudio detallado de las interacciones bacteria-célula, y simulan la superficie encontrada *in vivo* por las bacterias que producen endocarditis (19). Aunque este sistema biológico ha sido utilizado para estudiar la invasión-ingreso de *Staphylococcus aureus* por medio de la célula endotelial (19,21), no se ha aplicado para analizar las interacciones *E. faecalis*-endotelio.

A pesar de que las células endoteliales no son células fagocíticas profesionales, su capacidad para fagocitar *in vitro* las bacterias de la especie *S. aureus* ya ha sido descrita (19-21). La novedad de nuestro trabajo radica en que muestra la presencia intracelular de *E. faecalis* Ef 2890 en los cultivos primarios de HUVEC inoculados con esta bacteria. Las bacterias se observaron dentro de vacuolas endocíticas, algunas empezando a formar tabiques. En los modelos similares de infección con *S. aureus* se ha postulado que la presencia intracelular de estas bacterias puede ser un elemento clave en la génesis de las vegetaciones en las válvulas sanas (7,19-21). Una posible inferencia surgida de relacionar nuestros resultados con los obtenidos con *S. aureus* es que puede estar ocurriendo este mismo fenómeno *in vivo* con *E. faecalis*. Si éste es el caso, las bacterias estarían entrando a un ambiente intracelular protegido, reproduciéndose y, tal vez, pasando a través de la barrera endotelial.

Un estudio reciente mostró la presencia en sangre, hígado, riñón, corazón y bazo de dos cepas de *E. faecalis* inoculadas endovenosamente en un modelo en ratón (22). Los autores sugirieron que la gravedad de las lesiones histopatológicas causadas por la cepa más virulenta podía deberse a su habilidad de cruzar la barrera endotelial. La presencia de bacterias en vesículas endocíticas intracelulares detectada por nosotros puede ayudar a insinuar la hipótesis de que *E. faecalis* utiliza un mecanismo de transcitosis bacteriana para atravesar la lámina endotelial y causar daño tisular. Aunque el promedio del porcentaje de invasión (0,18%) obtenido *in vitro* es bajo, puede tener significado biológico. Se ha reportado por otros autores que los porcentajes de invasión menores de 1 pueden llegar a ser importantes en un escenario *in vivo* (12).

Los resultados de este trabajo señalan que el modelo desarrollado basado en cultivos primarios de HUVEC puede ser una herramienta útil en el estudio de los mecanismos de patogenicidad que subyacen las patologías infecciosas del endotelio causadas por *E. faecalis*. En nuestro grupo, actualmente se están llevando a cabo experimentos tendientes a establecer el papel que la célula endotelial y la bacteria tienen en la invasión-ingreso descritos. Con ellos se espera esclarecer si la presencia intracelular de enterococos es debida a procesos de fagocitosis exhibidos por la célula endotelial en respuesta a los factores inductores producidos por la bacteria.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, Colciencias, proyecto número 13080412635. Los autores quieren expresar su agradecimiento al Instituto de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque por facilitarnos la cepa *E. faecalis* 2890 y a María Mercedes Posada por la lectura crítica del documento.

### Referencias

1. **Morrison AJ Jr, Wenzel RP.** Nosocomial urinary tract infections due to *Enterococcus*. Ten years' experience at a university hospital. Arch Intern Med 1986;146:1549-51.
2. **Malathum K, Murray BE.** Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. Drug Resist Update 1999;2:224-43.
3. **Murray BE.** The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev 1990;3:46-65.
4. **Panesso D, Ospina S, Robledo J, Vela MC, Peña J, Hernández O, Reyes J, Mejía G, Arias C.** First characterization of cluster of VanA glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in a Colombian Hospital. Emerg Infect Dis 2002;8:961-5.
5. **Arias CA, Reyes J, Zúñiga M, Cortés L, Cruz C, Rico CL, Panesso D.** Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. J Antimicrob Chemother 2003;51:59-68.
6. **McCormick JK, Tripp TJ, Dunny GM, Schlievert PM.** Formation of vegetations during Infective endocarditis excludes binding of bacterial-specific host antibodies to *Enterococcus faecalis*. J Infect Dis 2002;185:994-7.

7. **Beekhuizen H, van Furth R.** Growth characteristics of cultured human macrovascular venous and arterial and microvascular endothelial cells. *J Vasc Res* 1994; 31:230-9.
8. **Srisatjaluk R, Kotwal GJ, Hunt LA, Justus DE.** Modulation of gamma interferon-induced major histocompatibility complex class II gene expression by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2002;70:1185-92.
9. **Noel RF, Sato TT, Mendez C, Johnson MC, Pohlman TH.** Activation of human endothelial cells by viable or heat-killed Gram-negative bacteria requires soluble CD14. *Infect Immun* 1995;63:4046-53.
10. **Drevets DA.** *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *J Immunol* 1997; 158:5305-13.
11. **Drevets DA, Sawyer RT, Potter TA, Campbell PA.** *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* 1995;63: 4268-76.
12. **Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL.** Evidence for translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis* 1990;162:82-90.
13. **Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL.** Proposed mechanism for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988;10:958-76.
14. **Wells CL, Moore EA, Hoag JA, Hirt H, Dunny GM, Erlandsen SL.** Inducible expression of aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect Immun* 2000;68:7190-4.
15. **Gentry-Weeks CR, Karkhoff-Schweizer R, Pikis A, Keith J.** Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1999;67:2160-5.
16. **Sübmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E.** Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun* 2000;68:4900-6.
17. **Bertuccini L, Ammendolia MG, Superti F, Baldassarri L.** Invasión of HeLa cells by *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191:25-31.
18. **Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR.** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
19. **Ogawa SK, Yurberg ER, Hatcher VB, Levitt MA, Lowy FD.** Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 1985;50:218-24.
20. **Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA.** Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* 1986;54:833-6.
21. **Vann JM, Proctor RA.** Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time- and inoculum-dependent damage to endothelial cell monolayers. *Infect Immun* 1987;55:2155-63.
22. **Gentry-Weeks CR, Estay M, Loui C, Baker D.** Intravenous mouse infection model for studying the pathology of *Enterococcus faecalis* infections. *Infect Immun* 2003;71:1434-41.