

# Identificación de serogrupos de cepas locales de *E. coli* empleando espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Foto: Joaquina Malán

## Sylvia Cuchman

Licenciada en Análisis Alimentario. Estudiante de Posgrado, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. Asistente del Laboratorio de Espectroscopía y Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Uruguay.  
[scuchman@fq.edu.uy](mailto:scuchman@fq.edu.uy)

## Victoria Rodríguez

Licenciada en Análisis Alimentario. Tesis de Grado, UTEC, Paysandú, Uruguay. [maria.rodriguez@estudiantes.utec.edu.uy](mailto:maria.rodriguez@estudiantes.utec.edu.uy)

## Sofía Figueira

Licenciada en Análisis Alimentario. Tesis de Grado, UTEC, Paysandú, Uruguay. [ana.figueira@estudiantes.utec.edu.uy](mailto:ana.figueira@estudiantes.utec.edu.uy)

## Marianela Cremona

Ingeniera en Alimentos, MBA. Docente Asociada, Área de Microbiología, UTEC, Paysandú, Uruguay.  
[marianela.cremona@utec.edu.uy](mailto:marianela.cremona@utec.edu.uy)

## Edgardo Giannechini

Doctor en Ciencias Veterinarias, MSc. Laboratorio Regional Noroeste, DILAVE «Miguel C. Rubino», DGSC-MGAP, Paysandú, Uruguay. [egiannechini@mgap.gub.uy](mailto:egiannechini@mgap.gub.uy)

## Rodolfo Rivero

Doctor en Ciencias Veterinarias, MSc. Laboratorio Regional Noroeste, DILAVE «Miguel C. Rubino», DGSC-MGAP, Paysandú, Uruguay. [rodolfo.riverogarcia@gmail.com](mailto:rodolfo.riverogarcia@gmail.com)

## Ileana Corvo

Licenciada en Ciencias Biológicas, Dra. Profesora Adjunta, Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Uruguay.  
[icorvo@cup.edu.uy](mailto:icorvo@cup.edu.uy)

## Carolina Fontana

Química Farmacéutica, PhD. Profesora Agregada, Laboratorio de Espectroscopía y Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Uruguay. [cfontan@fq.edu.uy](mailto:cfontan@fq.edu.uy)

## 1- INTRODUCCIÓN

### Los carbohidratos de la superficie bacteriana: antígenos para vacunas

En la superficie de las bacterias se encuentran diferentes tipos de carbohidratos, algunos de los cuales se denominan polisacáridos (PS) debido a su gran tamaño; dentro de esta clasificación se destacan los polisacáridos capsulares (CPS) y los lipopolisacáridos (LPS). Estas biomoléculas son consideradas factores de virulencia críticos, protegiendo a la bacteria de la inmunidad del huésped y la fagocitosis, además de que promueven adherencia, colonización y formación de biofilms necesarios para su supervivencia. Como muchas de estas estructuras poseen características únicas que solamente están presentes en las bacterias, y además son capaces de desencadenar una respuesta inmunológica en el huésped (razón por la que se los denomina antígenos), pueden ser empleadas en el diseño de vacunas polisacáridicas simples o conjugadas. Las vacunas de este tipo que han tenido más éxito a nivel comercial se basan en el empleo de CPS, pero en el caso de bacterias Gram negativas no encapsuladas, los polisacáridos O-específicos (O-Ag) de los LPS (Figura 1) también pueden servir como antígenos blancos para el desarrollo de vacunas. Esta última estrategia requiere de un paso adicional de remoción del Lípido A por presentar características tóxicas para el huésped, y es necesario además conjugar el O-Ag a una proteína transportadora para lograr estimular una respuesta T-dependiente (responsable de inducir la

memoria inmunológica a largo plazo). En la formulación de estas vacunas puede emplearse tanto el O-Ag nativo, así como versiones modificadas del mismo, o bien oligosacáridos sintéticos análogos a regiones de estas biomoléculas. A lo largo de las últimas décadas un número considerable de vacunas basadas en este concepto, que tienen como blanco especies del género *Bordetella*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Escherichia*, *Francisella*, *Helicobacter*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*, han llegado a etapas clínicas y pre-clínicas (Zhu *et al.*, 2021). Si bien las cepas patogénicas de *E. coli* por lo general no producen enfermedades tan alarmantes como otros microorganismos, y los antibióticos son la primera opción de tratamiento frente a este tipo de infecciones, la rápida evolución de cepas multirresistentes es cada vez más preocupante y la posibilidad de contar con vacunas comerciales se vuelve una necesidad. En humanos estos patógenos pueden causar infecciones intestinales y del tracto urinario, o incluso llegar a producir neumonía, meningitis, bacteriemia y/o sepsis. En el ganado lechero pueden producir mastitis clínica o subclínica, así como diarrea en terneros jóvenes, produciendo perjuicios económicos anuales importantes en la producción ganadera.

### Serogrupos de *E. coli*

En el caso de *E. coli* la reactividad serológica de sus O-Ag se emplea para definir diferentes serogrupos, y por consiguiente esta clasificación está estrechamente vinculada a la estructura química de estas biomoléculas. Dependiendo de los factores de virulencia adquiridos las cepas de un determinado serogrupo pueden pertenecer a uno o más patotipos y, aunque actualmente se reconocen 182 serogrupos de esta especie (Furevi *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020), solamente una docena de ellos están siendo considerados en el desarrollo de vacunas de uso humano (Zhu *et al.*, 2021). Por ejemplo, se encuentra actualmente en etapas avanzadas de desarrollo una vacuna bioconjugada 10-valente que contempla a los diez serogrupos más prevalentes de *E. coli* que causan infecciones del tracto urinario en países desarrollados (serogrupos O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B y O75) (Fierro *et al.*, 2023). Un aspecto a tener en consideración es que el número de antígenos que pueden ser incluidos en una única vacuna se ve limitado desde el punto de vista práctico, por lo que la selección de éstos suele hacerse en función de la patogenicidad y prevalencia del serogrupo al que representan. Por esta razón, al plantearnos el desarrollo

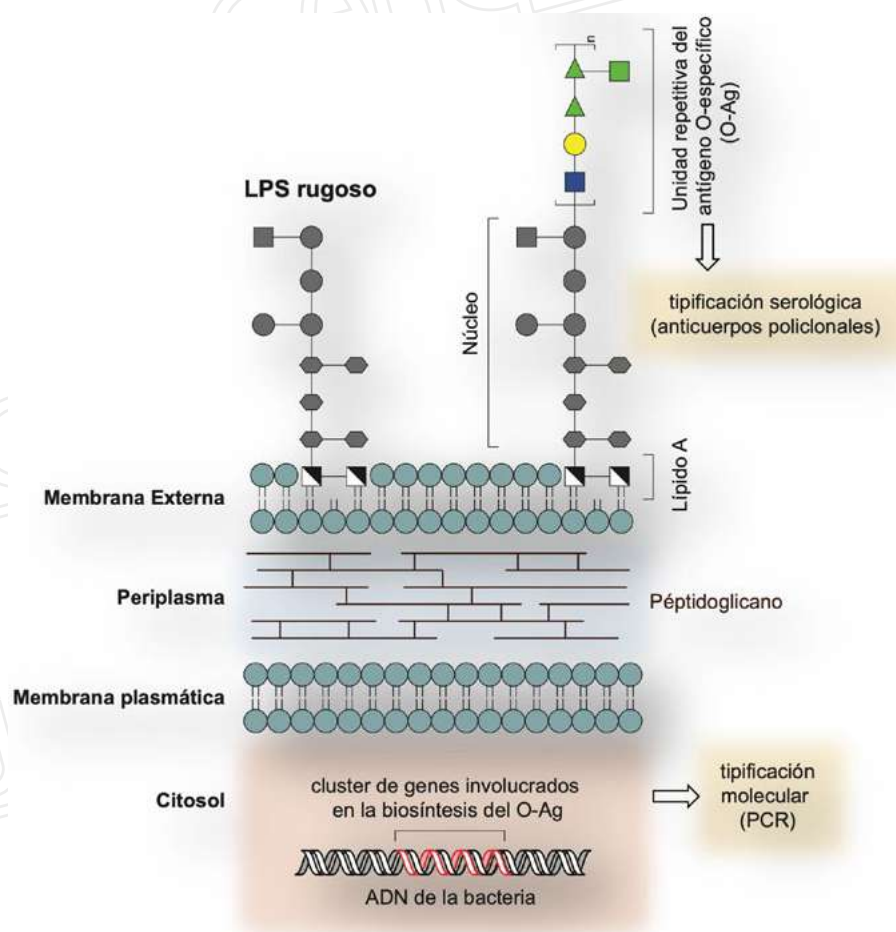


Foto: Sylvia Cuchman

**Figura 1.** Representación esquemática de la superficie de una bacteria Gram negativa indicando las diferentes regiones que componen a los lipopolisacáridos (LPS) de tipo liso y rugoso.

de nuevas vacunas (o evaluar la aplicabilidad de aquellas diseñadas para otros países) resulta crítico tener un buen conocimiento de los serogrupos circulantes en la región de interés, ya que estos no necesariamente se corresponden con los más prevalentes en otros países. En lo que concierne al área veterinaria, un ejemplo de esto es el caso de *Leptospira*, en la que uno de los serovares más prevalentes a nivel nacional no está contemplado en ninguna vacuna comercial (Zarantonelli *et al.*, 2018). Por esta razón es de interés contar con acceso a metodologías alternativas que permitan caracterizar los serogrupos/serovares de bacterias Gram negativas patógenas que circulan en la región, y contribuir a la creación de un cepario de referencia con aislados autóctonos, que eventualmente puedan ser empleados en la producción de material polisacárido para la formulación de nuevas vacunas o producción de antisuecos.

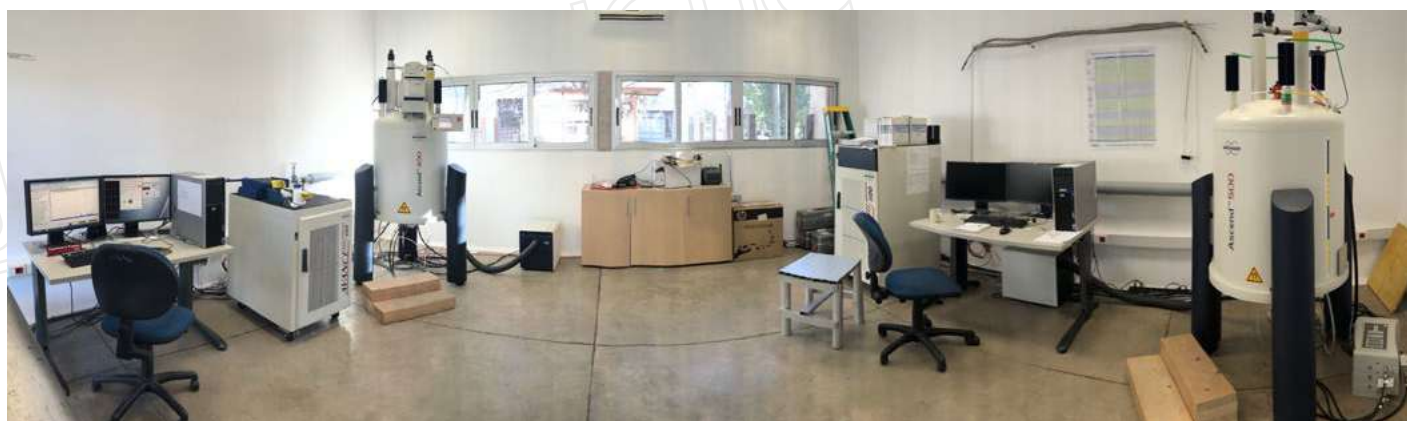
### Técnicas de tipificación

La identificación de serogrupos por métodos serológicos es un proceso laborioso y de alto costo, que requiere personal entrenado y acceso a un gran número de antisuecos; consecuentemente, son pocos los laboratorios a nivel mundial que pueden llevar a cabo un esquema completo de tipificación. Esta es una de las razones por la que muchos de estos estudios se limitan al análisis de unos pocos serogrupos de interés, quedando frecuentemente algunos aislados sin caracterizar. En las últimas décadas las técnicas basadas en tipificación molecular por PCR, en las que se analizan secuencias de genes claves involucrados en la biosíntesis del O-Ag, han cobrado importancia por ser accesibles a un mayor número de laboratorios, pero también requieren de la compra de reactivos específicos. Es interesante notar que estudios recientes basados en el análisis del genoma de cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) han permitido identificar cepas que aún no han sido catalogadas como pertenecientes a ninguno de los serogrupos reconocidos por técnicas serológicas, dejando incluso en evidencia que uno de estos genotipos representa al segundo grupo más prevalente de ETEC a nivel global

(Iguchi *et al.*, 2017).

Más allá de esto, una de las limitantes de esta técnica es que no permite prever modificaciones posteriores al procesamiento del O-Ag, y por consiguiente no permite discriminar entre algunos serogrupos que comparten el mismo *cluster* de genes involucrado en la biosíntesis del O-Ag, pero que expresan polisacáridos con estructuras químicas diferentes en su superficie. En forma análoga, el método serológico muchas veces no permite discriminar entre O-Ag que poseen estructuras químicas levemente diferentes, aunque difieran en los genes involucrados en sus biosíntesis. Cabe destacar que en la última década se ha producido un gran avance en la elucidación estructural de estas biomoléculas, lográndose completar la caracterización estructural del 100% de los O-Ag de *E. coli* que representan a los 178 serogrupos reconocidos de esta especie que expresan LPS del tipo liso en su superficie (Figura 1), así como definir unos cuantos subgrupos (por ej. *E. coli* O1 incluye los subgrupos O1A, O1B y O1C). Hoy en día, el análisis estructural de polisacáridos bacterianos se lleva a cabo casi exclusivamente empleando espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y los datos espectroscópicos de estos antígenos se encuentran disponibles tanto en la literatura como en las bases de datos ECODAB y CSDB que son de acceso libre (Rojas-Macias *et al.*, 2015; Toukach and Egorova, 2016). Por esta razón, en laboratorios que cuentan con acceso a espectrómetros de RMN (Figura 2) identificar serogrupos de aislados de *E. coli* a través de las señales de RMN de los átomos de hidrógeno y carbono presentes en sus O-Ag puede resultar una metodología accesible, ya que no requiere de la compra de reactivos y/o estándares específicos.

Una ventaja importante de esta técnica es que no solamente permite caracterizar los O-Ag incluidos en los esquemas de tipificación clásicos, sino además detectar fácilmente la aparición de cepas que producen polisacáridos con estructuras que no han sido reportadas previamente (incluyendo subgrupos dentro de un mismo serogrupo), y en esos casos proceder a realizar una caracterización es-



**Figura 2.** Laboratorio de Espectroscopía y Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral del CENUR Litoral Norte, Udelar, ubicado en la Estación Experimental «Dr. Mario A. Cassinoni». El laboratorio está equipado con dos espectrómetros de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance III de 400 y 500 MHz (izquierda y derecha, respectivamente).

estructural detallada de los mismos como se ha demostrado recientemente para dos nuevos aislados de esta especie (Qin *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022).

El conocimiento de la estructura química de estas moléculas también es clave para entender el comportamiento de reacciones serológicas cruzadas que se observan entre polisacáridos que presentan estructuras químicas similares. Como ventaja adicional, este tipo de técnicas también permite estudiar la estructura tridimensional de estos antígenos y sus derivados en solución, lo que puede resultar útil para evaluar las mejores estrategias de conjugación que permitan mantener las características del polisacárido nativo en la formulación de nuevas vacunas.

## 2- AVANCES DE RESULTADOS Y SUS IMPLICACIONES

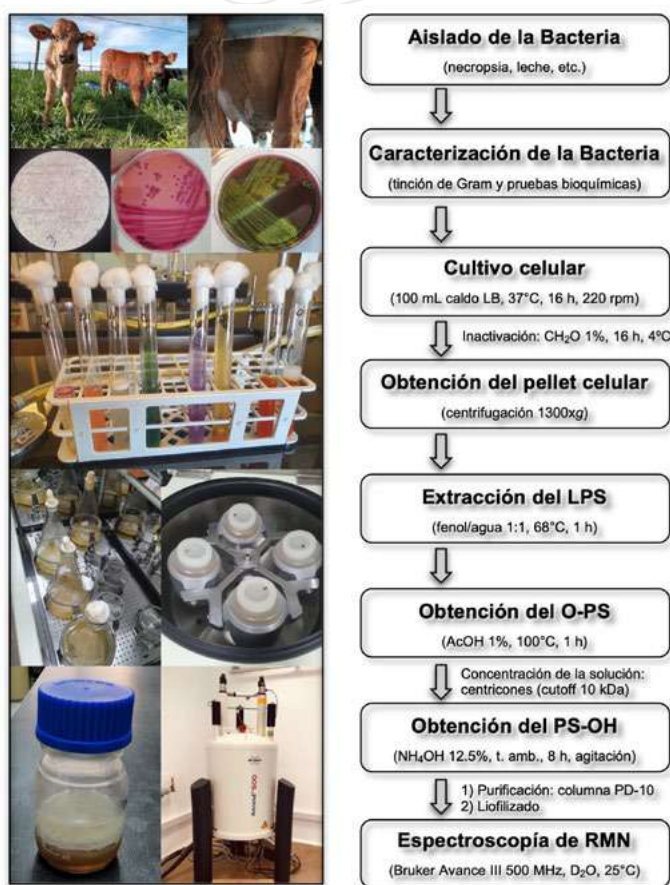
### Optimización de la obtención de polisacáridos

Las cepas de *E. coli* empleadas en este estudio fueron aisladas en el Laboratorio Regional de Paysandú del DILA-VE «Miguel C. Rubino» a partir de ganglios mesentéricos obtenidos durante necropsias de terneros afectados por diarrea (cepas SC-UY1, SC-UY4 y SC-UY5) o a partir de leche de vacas con mastitis (cepas SC-UY2 y SC-UY3). La especie se identificó utilizando tinción de Gram y pruebas

bioquímicas. Para la obtención de material polisacárido se comenzó trabajando sobre un protocolo genérico que involucraba el cultivo celular en medio Luria-Bertani (1L), seguido de la inactivación de la bacteria, la obtención del pellet celular, y extracción del LPS empleando una mezcla de fenol/agua 1:1 en caliente. El PS libre de lípido A (O-PS) fue obtenido a partir del LPS por tratamiento con ácido acético 1%, permitiendo así obtener un material con mejor solubilidad en medio acuoso y evitar la formación de micelas. Esto último es muy común en soluciones de LPS, lo que provoca un ensanchamiento en las señales en los espectros de RMN resultando en una disminución de la resolución y sensibilidad de los experimentos. Con el fin de mejorar la homogeneidad estructural de la preparación se decidió incorporar una etapa adicional de hidrólisis de grupos ésteres que pudieran estar presentes en la estructura, y obtener así un O-PS O-desacilado (PS-OH). Cada una de estas etapas fueron optimizadas, hasta obtener un protocolo optimizado (Figura 3) en el cual se logró reducir el volumen de cultivo inicial a 100 mL, y evitar etapas adicionales que se habían considerado inicialmente como la precipitación del LPS, diálisis y tratamientos enzimáticos con RNAsa, DNAsa y Proteinasa K, que suman varios días adicionales de trabajo. Los materiales obtenidos en las diferentes etapas fueron analizados empleando espectroscopía de RMN, con el fin de decidir las mejores estrategias para obtener la mayor cantidad de material posible, con un buen grado de pureza y en un tiempo razonable. En las condiciones actuales, el tiempo de análisis total es de una semana y pueden procesarse varias muestras en simultáneo.

### Análisis por espectroscopía de RMN

En los espectros de RMN de los PS-OH provenientes de los diferentes aislados pudo observarse que la calidad de las preparaciones es remarcable, siendo además la cantidad de material obtenido (~2 mg) suficiente como para adquirir espectros de RMN bidimensionales como los que se muestran en la Figura 4. En los espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC las diferentes señales representan correlaciones entre átomos de hidrógeno y carbono de cada uno de los componentes del O-Ag (indicados con diferentes letras en mayúsculas en la Figura 4). Los patrones de estas señales pueden ser empleados como huellas dactilares para identificar la estructura química de los polisacáridos, ya que la posición de cada una de ellas es altamente sensible a las características estructurales de cada molécula. La región del espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC que se muestra en la Figura 4 por lo general es suficiente para distinguir el serogrupo al que representan estos PS, facilitando la etapa de comparación de señales con bases de datos. El resto de las señales del espectro (que no se muestran en la figura) se usan en forma confirmatoria para validar



**Figura 3.** Esquema de trabajo optimizado para la obtención de polisacáridos O-específicos de *E. coli* libres de lípido A (derecha), e imágenes representativas del proceso (izquierda).

estas asignaciones.

A partir de la comparación de estos espectros con información disponible en bases de datos y literatura, fue posible identificar que los aislados SC-UY2, SC-UY3 y SC-UY5 pertenecen a los serogrupo O1C, O88 y O146 de *E. coli*, respectivamente. Es interesante notar que cepas pertenecientes a *E. coli* O1 están frecuentemente asociadas a infecciones del tracto urinario en humanos y por consiguiente es uno de los antígenos O-específicos de interés en la formulación de vacunas de uso humano. Pequeñas modificaciones estructurales en estos antígenos dan lugar a tres subgrupos diferentes (O1A, O1B y O1C), que si bien no pueden ser diferenciados por métodos serológicos resultan fácilmente distinguibles a través del análisis de sus PS-OH por espectroscopía de RMN. Por otro lado, cepas pertenecientes a *E. coli* O146 han sido asociadas a brotes en humanos en varias ocasiones, siendo uno de los quince serogrupos más prevalentes en casos clínicos en Estados Unidos asociados con cepas que producen toxina Shiga.

También es interesante notar que dos de los cinco aislados con los que comenzamos este estudio (SC-UY1 y SC-UY4) expresan antígenos O-específicos que no se corresponden a ninguno de los reportados para *E. coli*

ni para ninguna otra especie. Estas estructuras tampoco son consistentes con ninguno de los clústeres de genes involucrados en la biosíntesis de los O-Ag de genotipos no incluidos en los esquemas serológicos. Actualmente estamos trabajando en la caracterización estructural detallada de estos antígenos.

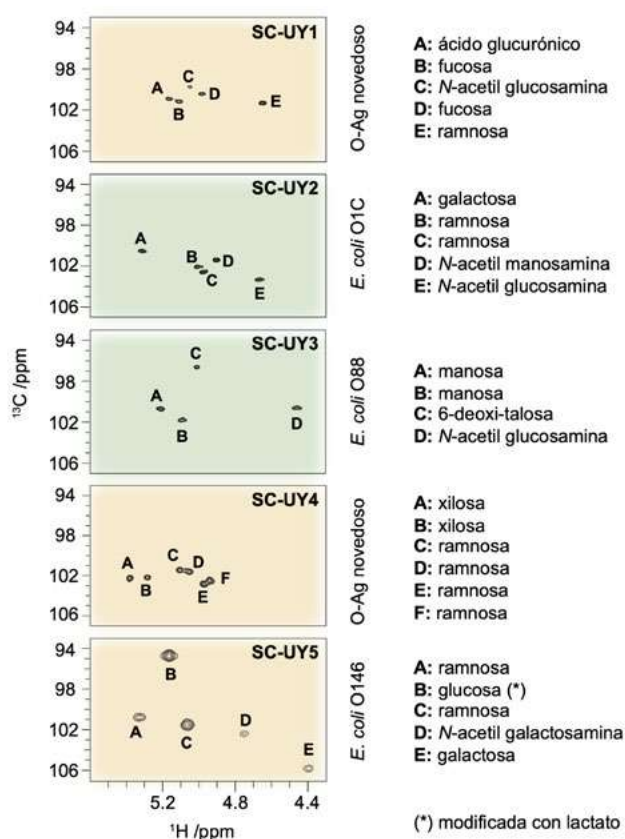
### 3- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio ponen en evidencia la importancia de tener acceso a metodologías alternativas para poder complementar estudios epidemiológicos y caracterizar cepas de bacterias patógenas circulantes en el país, que son de preocupación sanitaria tanto a nivel de salud humana como animal. Tener acceso a esta información es clave para establecer estrategias más efectivas a la hora de seleccionar los serogrupos a ser incluidos en vacunas que están en etapa de desarrollo, o evaluar la aplicabilidad en nuestro medio de aquellas diseñadas para otros países. El acceso a cepas autóctonas que producen O-Ag bien caracterizados, y los protocolos optimizados para su obtención, también representan insumos muy valiosos a la hora de producir materiales polisacáridicos.

Esta materia prima de alto valor agregado, puede ser de interés tanto para desarrollar nuevas vacunas, como para la producción de antisueros o el desarrollo de técnicas de diagnóstico. Particularmente, en el Departamento de Química del Litoral se viene trabajando en la obtención y caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas con polisacáridos de este tipo, como estrategia para el diseño de nuevas vacunas. Es importante señalar que si bien la metodología presentada en este trabajo se aplicó a aislados de *E. coli*, también puede ser fácilmente adaptable al estudio de otras bacterias Gram negativas para las que se cuenta con información espectroscópica de sus antígenos O-específicos, como por ejemplo los géneros *Serratia*, *Salmonella* y *Shigella*. La caracterización de antígenos O-específicos de bacterias del género *Leptospira* es un desafío que también se viene abordando en nuestro grupo de investigación, en colaboración con otros laboratorios de Montevideo, y pretende sentar las bases para tener una mejor comprensión de los serovares circulantes en nuestro país.

### 4- AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por financiar el proyecto I+D N° 291 en la convocatoria 2020. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar la beca de posgrado POS\_NAC\_M\_2020\_1\_164490 y POS\_NAC\_2022\_1\_173996. Al PEDECIBA Química y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI).



aislados de ganglios mesentéricos de necropsias de terneros

aislados de leche de casos de mastitis bovina

**Figura 4.** Regiones seleccionadas de espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC de los antígenos O-específicos de los aislados de *E. coli* analizados en este estudio, mostrando señales características de cada uno de los componentes del O-Ag (nombrados con diferentes letras).

## BIBLIOGRAFÍA

Fierro, C. A.; Sarnecki, M.; Doua, J.; Spiessens, B.; Go, O.; Davies, T. A.; van den Dobbelen, G.; Poolman, J.; Abbanat, D.; Haazen, W. 2023. Safety, reactogenicity, immunogenicity, and dose selection of 10-valent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* bioconjugate vaccine (VAC52416) in adults aged 60–85 years in a randomized, multicenter, interventional, first-in-human, phase 1/2a study. *Open Forum Infect. Dis.* 10, ofad417. doi: 10.1093/ofid/ofad417

Furevi, A.; Stähle, J.; Muheim, C.; Gkotzis, S.; Udekwu, K. I.; Daley, D. O.; Widmalm, G. 2020. Structural analysis of the O-antigen polysaccharide from *Escherichia coli* O188. *Carbohydr. Res.* 498, 108051. doi:10.1016/j.carres.2020.108051

Iguchi, A.; von Mentzer, A.; Kikuchi, T.; Thomson, N. R. 2017. An untypeable enterotoxigenic *Escherichia coli* represents one of the dominant types causing human disease. *Microb. Genomics* 3, 1–8p. doi:10.1099/mgen.0.000121

Liu, B.; Furevi, A.; Perepelov, A. V.; Guo, X.; Cao, H.; Wang, Q.; Reeves, P. R.; Knirel, Y. A.; Wang, L.; Widmalm, G. 2020. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 44, 655–683p. doi:10.1093/femsre/fuz028

Qin, C.; Hu, B.; Xu, Y.; Zhao, C.; Hao, W.; Wang, J.; Guo, X.; Li, R.; Hu, J.; Yin, J. 2022. Structural Elucidation and genetic identification of the O-antigen from a novel serogroup of *Escherichia coli* strain 2017LL031. *Carbohydr. Res.* 517, 108577. doi:10.1016/j.carres.2022.108577

Rojas-Macias, M. A.; Stähle, J.; Lütteke, T.; Widmalm, G. 2015. Development of the ECODAB into a relational database for *Escherichia coli* O-antigens and other bacterial polysaccharides. *Glycobiology* 25, 341–347p. doi:10.1093/glycob/cwu116

Toukach, P.V.; Egorova, K. S. 2016. Carbohydrate structure database merged from bacterial, archaeal, plant and fungal parts. *Nucleic Acids Res.* 44, D1229–D1236. doi:10.1093/nar/gkv840

Wang, J.; Xu, Y.; Qin, C.; Hu, J.; Yin, J.; Guo, X. 2022. Structural Determination and Genetic Identification of the O'Antigen from an *Escherichia coli* Strain, LL004, Representing a Novel Serogroup Jing. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12746. doi:10.1016/j.carres.2022.108577

Zarantonelli, L.; Suanes, A.; Meny, P.; Buroni, F.; Nieves, C.; Salaberry, X.; Briano, C.; Ashfield, N.; Da Silva Silveira, C.; Dutra, F.; Easton, C.; Fraga, M.; Giannitti, F.; Hamond, C.; Macías-Rioseco, M.; Menéndez, C.; Mortola, A.; Picardeau, M.; Quintero, J.; Ríos, C.; Rodríguez, V.; Romero, A.; Varela, G.; Rivero, R.; Schelotto, F.; Riet-Correa, F.; Buschiazzi, A. 2018. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1–22p. doi:10.1371/journal.pntd.0006694

Zhu, H.; Rollier, C.; Pollard, A. J. 2021. Recent advances in lipopolysaccharide-based glycoconjugate vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 20, 1515–1538p. doi:10.1080/14760584.2021.1984889



Foto: Karina Guichón