

en solución con tripsina y se analizó mediante ESI-MS/MS, dando también como resultado principalmente proteínas citoplasmáticas.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SAF2008-00733 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España.

### Referencia

- [1] Balonova L., et al. Bioanalytical tools for the discovery of eukaryotic glycoproteins applied to the analysis of bacterial glycoproteins. *Expert Rev. Proteomics* 2009; 6 (1): 75-85.
- [2] Capote F.P. y Sanchez J.C.. Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycosylated proteins. *Wiley InterScience* 2009 ; DOI 10.1002/mas.20187.
- [3] Greis K. et al. Selective Detection and Site-Analysis of O-GlcNAc-Modified Glycopeptides by B-Elimination and Tandem Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 1996; 234: 38-49.
- [4] Kaji H., et al. Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nature Biotechnology* 2003; v.21, n.6.
- [5] Mozano A., et al. Boronic acid-lectin affinity chromatography.1. Simultaneous glycoprotein binding with selective or combined elution. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389: 2097-2102.
- [6] Zhang H., et al. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nature Biotechnology*. 2003; v. 21, n. 6.

## Análisis de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* en leche por ionización mediante desorción por láser asistida por matriz, acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF)

Isabel Sospedra, Carla Soler, Jose Miguel Soriano, Jordi Mañes

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia. Universitat de València

### Resumen

Las bacterias del género *Staphylococcus* son microorganismos de amplia distribución, causantes de numerosas intoxicaciones alimentarias debido, en gran medida, a su capacidad de producir enterotoxinas. La enterotoxina del serotipo A es la que con más frecuencia aparece en los brotes de intoxicación alimentaria. En el presente trabajo se desarrolla una técnica de análisis de muestras de leche por MALDI-TOF para la detección de la enterotoxina A estafilocócica. Este método presenta como ventajas sobre las técnicas actualmente utilizadas su gran especificidad y elevada rapidez. Los resultados obtenidos mostraron la efectividad de la extracción

utilizada demostrando la utilidad del método de análisis utilizado.

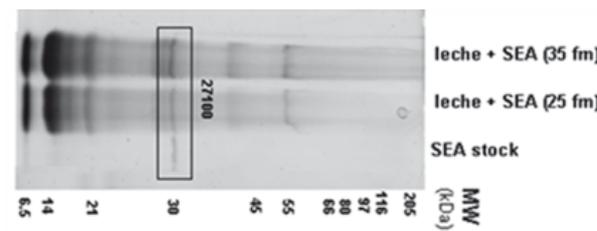
*Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena, de amplia distribución en la naturaleza, asociada a infecciones generalizadas y brotes alimentarios [1]. Algunas especies de estafilococos son productoras de una familia de proteínas no glicosiladas de bajo peso molecular ( $M_r$  22-31.000) conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (SEs). Estas enterotoxinas son causa de intoxicaciones alimentarias por la ingesta de productos contaminados, principalmente de origen cárnico y lácteo [2-3] destacándose la enterotoxina A [4], que es la que con mayor frecuencia se asocia a brotes de intoxicación alimentaria y que es extremadamente potente.

El presente trabajo pretende detectar la presencia de enterotoxina A en muestras de leche utilizando un método de extracción rápido y sencillo y detección por MALDI TOF.

Se utilizó patrón de enterotoxina A para fortificar a dos niveles diferentes 1 ml de leche procedente de supermercados locales. La extracción de la enterotoxina se llevó a cabo por precipitación de las caseínas de la leche con diclorometano (DCM)/H<sub>2</sub>O 5% ácido acético y centrifugación (6000 rpm). Las proteínas contenidas en el sobrenadante se separaron por electroforesis 1D-SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie. Las zonas del gel que contenían la enterotoxina (25-30KD) se cortaron y fueron sometidas a digestión triptica con la finalidad de obtener los fragmentos peptídicos correspondientes a la enterotoxina A.

La digestión en gel se realizó siguiendo una adaptación de protocolos estandarizados [5] con modificaciones menores. Posteriormente se prepararon las muestras en MTP AnchorChip (BrukerDaltonics), mediante la técnica de doble gota seca (depósito de matriz y evaporación de la misma; depósito de la muestra y evaporación de la misma), utilizando

0,5 µL de ácido α-ciano-4-hidroxycinámico como matriz, preparado a saturación en una mezcla de acetonitrilo/ácido trifluoroacético 0,1% al 70/30 % (TA 0,1%) y diluido 1:2 en TA 0,1%. Las muestras (0,5 µL) fueron analizadas en un Espectrómetro de Masas de tipo MALDI-TOF (Reflex IV de Bruker Daltonics). La identificación de las proteínas se realizó utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrixscience, UK).



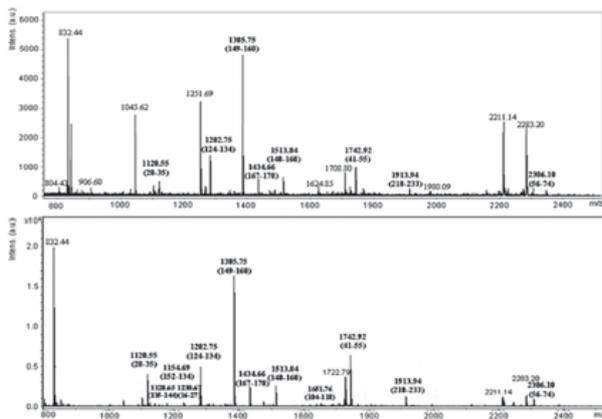
**Figura 1.** Imagen del aislamiento de la enterotoxina A de las proteínas del suero de la leche en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie.

La Figura 1 muestra la eficacia del método de extracción junto con la separación por electroforesis en gel para aislar la enterotoxina de la matriz láctea. Los resultados obtenidos tras la digestión triptica

**Tabla 1.** Secuencias peptídicas identificadas por MALDI-TOF tras la digestión triptica de enterotoxina A de *Staphylococcus aureus*.

Rango de péptidos	[M + H] <sup>+</sup> calculada	[M + H] <sup>+</sup> observada	Secuencia de péptidos
16-27	1229.65	1230.67	SELQGTALGNLK
28-35	1119.51	1120.55	QIYYNEK
42-55	1741.87	1742.92	ESHDQFLQHTILFK
56-74	2305.02	2306.10	GFFTDHSWYNDLLVDFDSK
104-118	1650.71	1651.76	TACMYGGVTLHDNNR
124-134	1281.73	1282.75	KVPINLWLDGK
125-134	1153.64	1154.69	VPINLWLDGK
135-144	1127.61	1128.65	QNTVPLETVK
148-160	1512.81	1513.84	KNVTVQELDLQAR
149-160	1384.72	1385.75	NVTVQELDLQAR
167-178	1433.64	1434.66	YNLYNSDVFDGK
218-233	1912.88	1913.94	TINSENMHIDIYLYTS

de las bandas del gel y el análisis de los péptidos por MALDI-TOF aparecen en la Figura 2, donde se muestran los fragmentos de enterotoxina A procedentes de la leche junto con el espectro obtenido del patrón. En la muestra de leche sólo aparecen 8 de los 12 fragmentos identificados en el patrón pero estos son suficientes para confirmar la presencia de enterotoxina A (Tabla 1). Con el método propuesto se consigue una buena purificación y aislamiento de la enterotoxina A, así como una identificación precisa de su presencia en muestras de leche.



**Figura 2.** Espectros de masas MALDI-TOF de las digestiones con tripsina. (A) Espectro correspondiente a patrón de toxina estafilocócica A. (B) Espectro correspondiente a la enterotoxina A aislada de la muestra de leche.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Conselleria de Sanitat el soporte de esta investigación. Generalitat Valenciana (072/2009).

## Referencias

- [1] Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N., Nostro, A.L. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Food Control .2007; 18: 196-200.
- [2] Chiang, Y., Liao, W., Fan, C., Pai, W., Chiou, C., Tsen, H. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. Int. J. Food Microbiol. 2008; 121: 66-73.
- [3] Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makin S. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. Appl. Environ. Microbiol., 2005; 71:2793-2795.
- [4] Dinges M, Orwin P & Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 16-34.
- [5] Andrej Shevchenko, Matthias Wilm, Ole Vorm, and Matthias Mann Mass, Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels, Anal. Chem. 1996; 68: 850-858.