

The Biologist (Lima), 2023, vol. 21 (1), 87-98.



The Biologist (Lima)



REVIEW ARTICLE / ARTÍCULO DE REVISIÓN

IDENTIFICATION OF ENVIRONMENTAL *VIBRIO CHOLERAE* NON 01 NON 139 BY MALDITOF MS

IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO CHOLERAE* NO 01 NO 139 AMBIENTAL POR MALDITOF MS

Alejandra E. Cúneo^{1,2} & Armando Vélez-Azañero^{1,3*}

¹ Universidad Nacional Federico Villarreal. Facultad de ciencias Naturales y Matemática. Av Rio Chepen S/N, El Agustino, Lima, Perú.

² Instituto Nacional de Salud. Laboratorio de Referencia en Enteropatógenos. Jirón Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú.

³ Municipalidad Distrital de Lurín. Gerencia de Servicios públicos y gestión ambiental. Jr. Grau 399. Lurín, Lima, Perú.

* Corresponding author: avelez@unfv.edu.pe

Alejandra E. Cúneo:  <https://orcid.org/0000-0003-2449-1660>
Armando Vélez-Azañero:  <https://orcid.org/0000-0003-4246-1502>

ABSTRACT

Most *Vibrio* species identification methods take many days to deliver results, therefore it is important that research can be done on rapid and accurate detection and identification techniques. MALDI-TOF MS has proven to be a simple tool to identify and differentiate pathogens. The objective of this research was to recognize the available bibliographic information on the identification of *Vibrio cholerae* species non 01 non 139 of environmental origin by MALDI TOF MS. The *Vibrio* genera includes more than thirty species found in aquatic environments, some species cause diseases in both marine and human species. One of these organisms is *V. cholerae*, one of the most important species due to the production of cholera toxin (CT) which interrupts the transport of ions in the cells of the intestinal epithelium. The number of case reports involving *V. cholerae* no 01 no 139 in extraintestinal infections and potentially fatal bacteremia in healthy patients has increased and, despite the existence of molecular identification techniques such as PCR, sequencing, and gel electrophoresis pulsed-field, the MALDI TOF MS technique has been gaining ground in bacteriology laboratories in hospitals due to its speed and ease of use. There are studies that cover the detection of *V. cholerae* in MALDI-TOF MS, focusing on food and environment, however, when performing the search key, no specific studies on the detection of *V. cholerae* non 01 non 139 of environmental origin by MALDI TOF MS were found with the exception of a case report, presence in blood isolates, reviews of reports that indicate the importance of these microorganisms in the cause bacteremia and the importance of this technique for the future of bacterial identification. Therefore, is recognized that

Este artículo es publicado por la revista The Biologist (Lima) de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.

DOI: <https://doi.org/10.24039/rtb20232111529>

there is a need to continue producing new information to contribute to the implementation of genomic surveillance capable of predicting future epidemic outbreaks.

Keywords: bacteria – cholera – proteins – review – serotype

RESUMEN

La mayoría de los métodos de identificación de especies de *Vibrio* tardan muchos días en ofrecer resultados, frente a ello, la técnica MALDI-TOF MS ha demostrado ser una herramienta rápida y sencilla para identificar y diferenciar patógenos. El objetivo de la investigación fue reconocer la información bibliográfica disponible sobre la identificación de especies de *Vibrio cholerae* no 01 no 139 de procedencia ambiental por MALDI TOF MS. El género *Vibrio* incluye más de treinta especies comúnmente encontradas en ambientes acuáticos donde algunas causan enfermedades en especies marinas y el hombre. *V. cholerae*, una de las especies más importantes debido a la producción de la toxina colérica que interrumpe el transporte de iones en las células del epitelio intestinal. Se han incrementado el número de reporte de casos que incluyen a *V. cholerae* no 01 no 139, en infecciones extra intestinales y bacteriemias potencialmente fatales en pacientes saludables y, a pesar de que existen técnicas de identificación molecular como el PCR, secuenciamiento y electroforesis en gel por campo pulsado, la técnica de MALDI TOF MS ha ido ganando terreno en laboratorios de bacteriología en hospitales debido a su rapidez y facilidad de uso. Existen estudios que abarcan el tema de detección de *V. cholerae* en MALDI-TOF MS, enfocándose en alimentos y medioambiente, sin embargo, al realizar la búsqueda, no se encontraron estudios específicos sobre la detección de *V. cholerae* no 01 no 139 de procedencia ambiental por MALDI TOF MS a excepción de un reporte de caso, presencia en aislamientos sanguíneos, revisiones de reportes que indican la importancia de estos microorganismos en la causa de bacteriemias y la importancia de esta técnica para el futuro de la identificación bacteriana. Por tanto, se reconoce la necesidad de seguir produciendo nueva información para contribuir en la implementación de una vigilancia genómica capaz de predecir futuros brotes epidémicos.

Palabras clave: bacteria – cólera – proteínas – revisión – serotipo

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos acuáticos pueden tener la facultad de ser patogénicos, causando brotes epidémicos y zoonosis en condiciones favorables. Un grupo importante lo representan algunas especies del género *Vibrio*, comúnmente encontrados en ambientes marinos-costeros, en la superficie de especies o acumulados en organismos filtradores como las conchas de abanico, mejillones, gasterópodos, entre otros (Ashfaq *et al.*, 2019). Especies como *Vibrio parahaemolyticus* (Hollis *et al.*, 1976), *V. vulnificus* (Farmer, 1980) y *V. cholerae* (Pacini, 1854), causan enfermedades gastrointestinales al contacto con el ser humano (Zhang *et al.*, 2020) además de múltiples casos de bacteriemias (Engel *et al.*, 2016), llegando a causar la muerte en pacientes inmunocomprometidos (Zhang *et al.*, 2020).

La literatura indica que *V. cholerae* no 01 no 139 presenta genes de virulencia en una isla de patogenicidad homóloga llamada VPai-7 (Olivares *et al.*, 2019) presente

en *V. parahaemolyticus*, que codifica para un sistema de secreción tipo III que contribuye a la virulencia de estas cepas (Calder *et al.*, 2014). Convirtiéndolo en un organismo de importancia médica, ya que la expansión en la presencia de esta isla de patogenicidad en cepas no toxigénicas podría tener un impacto directo en la salud de la población (Schwartz *et al.*, 2019).

La mayoría de los métodos de caracterización e identificación de especies de *Vibrio* están basados en la aplicación de metodologías de cultivo, morfológicas y bioquímicas, que suelen tardar muchos días en ofrecer un resultado (Buller, 2004; Wu *et al.*, 2020). Por tanto, es importante que se investiguen técnicas de detección e identificación rápidas y precisas (Tsuchida & Nakayama, 2022). El análisis por MALDI-TOF es una herramienta sencilla para identificar y diferenciar patógenos bacterianos a nivel de especie (Maldonado *et al.*, 2017), tiene como ventaja, la generación y comparación rápida de espectros de masas, cuyos picos representan las proteínas celulares, estas proteínas pasan a través de un potencial fijo, el cual

las separa y ordena en base a su rango masa/carga donde son detectados utilizando una variedad de programas que toman en cuenta el tiempo de vuelo o TOF por sus siglas en inglés (Croxatto *et al.*, 2012; Erler *et al.*, 2015).

El objetivo de la investigación fue reconocer la información bibliográfica disponible sobre la Identificación de especies de *V. cholerae* no 01 no 139 de procedencia ambiental por espectrometría de masas MALDI TOF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión descriptiva de documentos significativos para el objetivo de la investigación; mediante la búsqueda exhaustiva en el portal Google académico con la siguiente clave “maldi tof ms” marine vibrio non 01 non 139 identification, localizando un total de 849 resultados, de los cuáles se eligieron 30 documentos por cumplir con los criterios de identificar los aspectos relevantes del tema como aproximaciones metodológicas e información teórica de la técnica de MALDI TOF MS, además de mostrar la evidencia disponible de los casos de *V. cholerae* no 01 no 139.

Aspectos éticos: el presente estudio no presenta ningún conflicto ético.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Género *Vibrio*

El género *Vibrio* incluye más de treinta especies comúnmente encontradas en ambientes acuáticos, algunas especies causan enfermedades tanto en especies marinas como en humanos. Los vibrios son bastones cortos Gram negativos, usualmente curvos y motiles por un solo flagelo polar (Thompson *et al.*, 2005). Son aerobios facultativos que producen enzima oxidasa en su mayoría y tienen reacción de indol positiva (Chart, 2012). El género puede ser dividido en vibrios halófilos y no halófilos por su crecimiento en presencia de salinidad. La mayoría crece a 30 °C, pero algunas especies halófilas crecen a 37°C; sin embargo, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* crecen a 42°C. Los vibrios tienen baja tolerancia a condiciones ácidas y prefieren condiciones alcalinas con un rango de pH de 6,8 a 10,2, creciendo idealmente en un pH entre 7,4 y 9,6. Este género de bacteria es de gran importancia debido a su capacidad de causar brotes epidémicos en humanos (Shin *et al.*, 2011) y a su estrecha relación con diversos componentes

del ecosistema marino, en el cual se ha demostrado que estos organismos tendrán tendencia a aumentar debido al incremento de la temperatura en estos ambientes (Vezzulli *et al.*, 2016, 2020).

Género *Vibrio* y el ambiente

Los vibrios son bacterias que se encuentran distribuidas en el medio acuático, habitando especies que forman parte de la cadena trófica en los ecosistemas marinos (halófilas). Su rango de distribución varía según las características del ambiente, determinado por los niveles de salinidad y temperatura (Kaspar & Tamplin, 1993). Existe una relación directa entre el aumento de la salinidad y temperatura del agua de mar, y el aumento de brotes infecciosos causados por patógenos (Kaspar & Tamplin, 1993), lo que es fundamental para entender el riesgo que éstos representan, sobre todo con el aumento de la temperatura debido al cambio climático e igualmente a la variación de la salinidad debido al aumento de lluvias (Lip *et al.*, 2002; Vezzulli *et al.*, 2016; Baker-Austin *et al.*, 2017). Es importante monitorear estos brotes epidémicos con sistemas de vigilancia por temporadas, ya que podrían ser más frecuentes en el futuro.

Especies de *Vibrio* de importancia patógena

Las especies patógenas de *Vibrio* de origen humano se clasifican ampliamente en función de los tipos de enfermedades que presentan, incluido un grupo que causa enfermedades extraintestinales y otro grupo que causa enfermedades gastrointestinales. Dalsgaard (1998) asocia doce especies que pueden causar enfermedades por alimentos, de las cuáles la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2001; Summer *et al.*, 2001; Plaza *et al.*, 2018) menciona que tres especies producen la mayoría de infecciones patogénicas en humanos: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

Vibrio parahaemolyticus

Es una bacteria Gram negativa halófila distribuida en ecosistemas costeros que produce los antígenos somáticos (O) y capsulares (K) (Caro-Castro *et al.*, 2020). Está estrechamente relacionada a brotes de infección por gastroenteritis en Japón y otros países asiáticos (Lee *et al.*, 2001; Malainine *et al.*, 2013; Elmahdi *et al.*, 2016) y puede causar septicemia en pacientes susceptibles. El factor de virulencia en *V. parahaemolyticus* es una hemolisina de tipo beta identificada como Hemolisina directa termoestable (TDH), ya que no puede ser inactivada a 100 °C. La actividad biológica de la TDH incluye hemólisis de los eritrocitos en animales, citotoxicidad,

letalidad en animales pequeños de experimentación e incremento en la permeabilidad vascular. En humanos se ha demostrado que la TDH es un factor de virulencia que ocurre en el 90% de las cepas aisladas (Okuda *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2019).

Vibrio vulnificus

Es una bacteria Gram negativa, halófila, móvil que no forma esporas. Se encuentra en las ostras, almejas y mariscos de aguas costeras o en desembocaduras de ríos, en sedimento y plancton (Ünür, 2018). Está asociada a mortalidad en personas con enfermedades pre existentes o con condiciones de riesgo que consumen alimentos marinos crudos o que presentan heridas expuestas en agua de mar (Lee *et al.*, 2008; Bier *et al.*, 2015). *V. vulnificus* posee una cápsula de mucopolisacáridos los cuáles aumentan su resistencia a antibióticos, además produce proteasas, citolisinas hemolisinas, hialuronidasas y DNAsas. Esta bacteria usualmente causa fiebre, escalofríos, edema en brazos y piernas hasta llegar a un cuadro de shock séptico (Zuñiga & Caro, 2014). La información de *V. vulnificus* que se encuentra en Perú a diferencia de sus pares *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* no es muy variable, esto puede deberse a la poca incidencia de casos de vibriosis causado por éste patógeno, a pesar de haber encontrado en países como Estados Unidos, China, India y el Sudeste Asiático (Elmahdi *et al.*, 2016).

Vibrio cholerae

Es una de las especies patógenas más importantes debido a la producción de toxina colérica (CT) que interrumpe el transporte de iones en las células del epitelio intestinal, produciendo deshidratación (Faruque *et al.*, 1998; Heidelberg *et al.*, 2000). *V. cholerae* posee genes que codifican un factor conocido como toxin-coregulated pilus (TCP) y una proteína reguladora ToxR que corregula la expresión de CT y TCP, la tox R es regulador de 17 genes, por lo cual la patogénesis de *V. cholerae* recae sobre un efecto en cadena (Robles *et al.*, 1999, Rivera-Chávez & Mekalanos, 2019). Una característica es su capacidad epidemiológica de producir brotes estacionales en áreas de infección endémica, indicando factores ambientales que desencadenan los procesos epidémicos. Durante estos procesos, las formas virulentas de *V. cholerae* pueden ser encontradas, sin embargo, cuando estos procesos disminuyen, no pueden ser aislados del ambiente (Islam *et al.*, 2020).

Serogrupo y Serotipos de Vibrio cholerae

Vibrio cholerae comprende más de 200 serogrupos basados en el antígeno O, sin embargo, solo el O1 y el

O139 son conocidos por causar las epidemias de cólera (Marin *et al.*, 2013). El grupo O1 es dividido en dos biotipos denominados “El tor” y “clásico”, determinado por distintas propiedades fisiológicas (Pruzzo *et al.*, 2005). Cada biotipo presenta tres serotipos distintos denominados “Inaba”, “Ogawa” y “Hikojima”. Los vibrios que no aglutinan en suero para el serogrupo O1 o el O139 son considerados como *V. cholerae* no-O1 no-139 y eran previamente considerados como vibrios no aglutinantes o no coléricos, pero ahora son considerados como especies de *V. cholerae* (Borrotto, 1997). Algunas especies pertenecientes a este grupo producen toxinas y causan casos esporádicos de cólera y pequeños brotes de diarrea sin llegar a ser epidemias.

Vibrio cholerae no O1 no 139

A diferencia de los vibrios que causan brotes epidémicos, los vibrios no O1 no O139 raramente expresa factores de virulencia. La principal enfermedad producida por *Vibrio cholerae* no O1 no O139 es la gastroenteritis (Deshayes *et al.*, 2015), además, los serogrupos no O1 no O139 causan infecciones en heridas, oídos y en algunos casos, sepsis (Dutta *et al.*, 2013). Esta manifestación es rara y se ha reportado en individuos inmunocomprometidos. Recientemente se han incrementado el número de reporte de casos que incluyen a este grupo de *V. cholerae*, en infecciones extraintestinales y bacteremias potencialmente fatales en pacientes saludables (Deshayes *et al.*, 2015; Maraki *et al.*, 2016).

También se han encontrado reportes de una posible transferencia horizontal de genes de *V. parahaemolyticus* hacia cepas no toxigenicas de *V. cholerae*, los cuáles han conllevado a apariciones de casos clínicos graves reportados de este grupo de cepas, lo cual podría tener un aumento en casos de enfermedad (Olivares *et al.*, 2019). Los aislamientos de *V. cholerae* no O1 no O139 son capaces de sobrevivir y multiplicarse en un amplio rango de animales marinos, esta característica explica su asociación a ambientes acuáticos y a consumo de animales de estos ambientes (Vezzulli *et al.*, 2013; Vezzulli *et al.*, 2020); sin embargo, en algunos casos no se presentan conexiones a ambientes acuáticos y/o marítimos, por lo que se investiga la posibilidad de que existan otras fuentes de infección (Pruzzo *et al.*, 2005).

Técnicas microbiológicas para detección de *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae es inhibido en su crecimiento por los medios usados normalmente para diagnóstico de bacterias entéricas como Agar MacConkey o agar EMB (Finkelstein, 1996). Un medio efectivo de selección es el Agar tiosulfato-citrato-

salesbilares-sucrosa o TCBS en donde por la fermentación de sucrosa, los *V. cholerae* crecen formando colonias amarillas, sin embargo, su identificación final dependerá del uso de antisueros específicos para ver la presencia o ausencia de aglutinación (Bhattacharyya, 1977). Además, se recomienda que para detectar *V. cholerae* de agua y alimentos se realicen procesos de enriquecimiento como el uso de caldo peptona alcalino (pH 8,5) en un periodo de incubación de seis horas el cuál ayudará a las bacterias en su crecimiento (Perilla *et al.*, 2004). A pesar de que las técnicas microbiológicas son las más usadas alrededor del mundo debido a su estandarización, éstas tienden a tomar bastante tiempo y necesitan una amplia logística para su uso por lo cual están quedando desfasadas ante las nuevas técnicas moleculares.

Identificación bioquímica de *V. cholerae*

En el caso de que se identifique la especie *V. cholerae*, pero no se encuentre aglutinación en antisueros, se requieren pruebas adicionales como oxidasa (Huq *et al.*, 2012), test de la cuerda (Marval *et al.*, 2012), y otras pruebas como decarboxilasas (arginina, lisina, ornitina) y finalmente la inhibición por el componente vibriostático, el cuál ayuda en la diferenciación entre *Vibrio* (sensible al componente) y *Aeromonas* (resistente al componente). Este último test bastante controversial debido a que existen reportes de *V. cholerae* no 01 y no 139 que fueron resistentes a este componente (Abbot *et al.*, 1992; Bravo-Fariñas *et al.*, 2007). Este tipo de técnicas para caracterización de bacterias últimamente se apoya en las técnicas moleculares para dar una mayor solidez a sus resultados debido a la dificultad en su interpretación.

Técnicas moleculares para detección de *Vibrio cholerae*

Para la identificación de *V. cholerae* se utiliza métodos de pruebas bioquímicas convencionales, después del aislamiento de las placas de agar selectivo sigue siendo uno de los métodos de diagnóstico más comunes (Ebob, 2020). Otros métodos que requieren el uso de enfoques fenotípicos tienen algunos contratiempos importantes, ya que suelen requerir mucho trabajo, mucho tiempo y períodos de espera más largos para obtener los resultados, lo que retrasa el comienzo del tratamiento (Rammamurthy *et al.*, 2020; Al-Hilu *et al.*, 2019). Frente a esto, se han desarrollado una gran variedad de técnicas moleculares para la detección de *V. cholerae* de las cuáles algunas de las más importantes serán desarrolladas en esta revisión (Huger *et al.*, 2000)

Electroforesis en gel por campo pulsado

Es uno de los estándares para identificar *V. cholerae* debido a su alta capacidad para distinguir entre

aislamientos estrechamente relacionados a esta especie (Zamudio *et al.*, 2011; Neoh *et al.*, 2019). El principio funciona a través del clivaje de ADN genómico altamente purificado por la enzima de restricción endonucleasa que produce fragmentos de restricción que luego se visualizan en fragmentos separados que pasan a través de un campo pulsado, de los cuáles los fragmentos más grandes son separados fácilmente (Goering, 2010). Una de las desventajas del uso de esta técnica es que los resultados pueden ser fácilmente cambiados por pequeñas mutaciones en los sitios de restricción (Ebob, 2020), además de requerir equipos de campo pulsado, personal calificado y abarcar una amplia cantidad de tiempo en su realización.

Reacción de cadena de la polimerasa

Los métodos de detección de *V. cholerae* por Reacción de cadena de la polimerasa o PCR para cada especie de *Vibrio* requieren factores de virulencia específicos como marcadores genéticos (Rahaman *et al.*, 2015; Rivera *et al.*, 2003). En el caso de *V. cholerae* tenemos el gen *ctxA* que codifica la subunidad A de la toxina colérica para detección de toxina colérica; *ctxB*, el gen *zot* para enterotoxina, gen *ace*, gen *orfU*, gen *pTLC*, gen *ompW* o gen de la membrana externa de la subunidad proteica *W*; gen *toxR* encargado de la regulación del operon *ctxAB*; y en el caso de la detección para *V. cholerae* no 01 no 139 tenemos la toxina termoestable *ST* la cuál es exclusiva (Carrascal-Huyhua, 2018). La técnica de PCR es la más empleada en biología molecular por ser el gold estándar y brindar información precisa al momento de identificar los microorganismos.

Secuenciamiento

El análisis de genoma completo ayuda a entender la estructura filogenética del *V. cholerae* demostrando ser una poderosa herramienta en salud pública. Enfocándose en la estructura bacteriana, capacidad de virulencia y evolución para posteriormente ahondar en la estructura genómica respondiendo preguntas a nivel biológico, ecológico y epidemiológico (Martinez-Urtaza *et al.*, 2017). El primer genoma de *V. cholerae* fue publicado en el año 2000 por Heidelberg y a partir de allí ha ido evolucionando para en los últimos años con el Whole Genome Sequencing (WGS) mejorar el conocimiento de la evolución molecular y la transmisión de agentes etiológicos causantes de enfermedades, incluyendo *V. cholerae* (Baker-Austin *et al.*, 2017). Aunque la técnica de secuenciamiento es la más completa a nivel molecular, aún sigue siendo bastante costosa, necesitando de recursos y personal especializados.

MALDITOF MS

La espectrometría de masas ha progresado enormemente en los últimos años, siendo aplicada ampliamente en múltiples campos para facilitar la identificación de diversos organismos debido a la capacidad de esta técnica de identificar biomarcadores a través de un análisis de proteínas y de su facilidad de uso (Erler *et al.*, 2015). Este método se caracteriza por ser mucho más rápido a otros métodos convencionales, como el cultivo de microorganismos por técnicas microbiológicas y bioquímicas, detección directa de pruebas de antígeno y pruebas moleculares de detección y amplificación de genes. El primer reporte de un laboratorio clínico bacteriológico fue dado en 2009 (Seng *et al.*, 2009), a partir de este periodo los artículos de investigación basados en esta técnica han ido incrementando en los años (Tsuchida & Nakayama, 2022), ganando terreno en laboratorios de bacteriología en hospitales.

Principio y Características

Se utiliza una matriz con una banda de absorción de 337 nm, ya que la muestra combinada con la matriz (ácido alfa-Cyano-4-hydroxycinnámico) es irradiada con un láser de alta densidad, la matriz primero absorbe los fotones del láser y se encuentra en un estado excitado (Croxatto *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, la temperatura del cristal de la combinación con la muestra aumenta, encontrándose a una temperatura de evaporación en donde la muestra y la matriz se subliman (Tsuchida & Nakayama, 2022), las proteínas en la muestra sublimada van a través de una ionización química por medio de la matriz en estado excitado. La muestra ionizada es acelerada por un campo eléctrico donde las masas de los iones ganarán diferentes velocidades. Debido a que los iones viajan a través de una distancia fija, su peso molecular es determinado midiendo el tiempo de vuelo de cada ion y el tiempo de llegada de los iones es convertido a un espectro de masa (Liyanage & Lay, 2013; Sauget *et al.*, 2017).

Preparación de muestras para MALDI-TOF MS

Existen tres formas de preparar las muestras para lectura por MALDI-TOF MS: Por método directo, por método "on plate" o sobre placa y por el método de extracción con ácido fórmico y etanol (Drevinek *et al.*, 2012). El método directo utiliza colonias frescas de un medio no selectivo las cuales son aplicadas directamente a la placa MALDI en forma de capa delgada, posteriormente se le agrega una gota de la matrix de MALDI y se deja secar para dar lectura (Tsuchida & Nakayama, 2022). El método sobreplaca a diferencia del método directo, utiliza una gota de ácido fórmico antes de la colocación

de la muestra, el ácido fórmico ayuda a la destrucción de la pared celular de algunos microorganismos de pared celular más gruesa como es el caso de las bacterias Gram positivas y algunas levaduras (Chen *et al.*, 2021).

Finalmente, tenemos la técnica de extracción con ácido fórmico y etanol (Drevinek *et al.*, 2012), la cual se utiliza en microorganismos, en los cuáles el método sobreplaca no fue suficiente para la identificación como lo es en el caso de hongos, bacterias del género *Nocardia*, entre otros (Weller *et al.*, 2015; Yarbrough *et al.*, 2017). Una de las grandes ventajas de MALDI-TOF MS es el uso del mismo principio o técnica independientemente del tipo de bacteria que contenga la muestra, ya sea aeróbica, anaeróbica o levadura, lo cual hace posible obtener mejoras en la eficiencia y en la reducción de desecho de reactivos.

Técnica MALDITOF MS para detección de *Vibrio cholerae* no 01 no 139 de procedencia ambiental

Son múltiples los estudios que abarcan el tema de detección de *V. cholerae* para MALDI-TOF MS (Dieckmann & Strauch, 2009; Sogawa *et al.*, 2011; Bohme *et al.*, 2013; Gerdts *et al.*, 2013; Afanasev *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015; Erler *et al.*, 2015; Rychert *et al.*, 2015; Taneja *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2017; Bronzato *et al.*, 2018; Mougín *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020), incluyendo a su vez bases de datos que enriquecen la detección de éstos microorganismos en la cadena de alimentos (Bohme *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2016) y en el medioambiente (Gerdts *et al.*, 2013; Popovic *et al.*, 2017; Ashfaq *et al.*, 2019), inclusive reportes de la detección de serotipos para bacterias relacionadas (Li *et al.*, 2018; Hazen *et al.*, 2009). Sin embargo, al momento de realizar la clave de búsqueda, no se encontraron estudios específicos que indiquen la detección de *V. cholerae* no 01 no 139 de procedencia ambiental por MALDI TOF MS con excepción a un reporte de caso (Olivares, 2019), aunque si se encontraron estudios que identificaron *V. cholerae* no 01 no 139 en aislamientos sanguíneos en los cuales los autores pudieron armar su propia base de datos (Cheng *et al.*, 2015; Erler *et al.*, 2015).

También se encontraron estudios de revisiones de reportes de casos que indican la importancia de estos microorganismos debido a su prevalencia en la causa de bacteriemias (Engel *et al.*, 2016; Marinello *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020) y estudios que compilan la importancia de esta técnica para el futuro de la identificación bacteriana (Seng *et al.*, 2010; Croxatto *et al.*, 2011; Sandalakis *et al.*, 2017). Demostrando que esta metodología sería la mejor opción para la detección de *V. cholerae* no 01 no 139 de procedencia ambiental y que

también existe una necesidad en crear una base de datos específica para estos microorganismos.

Se concluye que el estudio de *V. cholerae* a pesar de ser ampliamente abarcado, tiene muchas interrogantes con respecto a su epidemiología y ciclo de vida, más aún dentro de los serogrupos y de las especies que no pertenecen a los llamados “vibrios coléricos”, como es el caso de *V. cholerae* no 01 no 139, al cual no se le da mayor importancia por su baja prevalencia en la población, pero que a la vez reporta casos de ocurrencia de enfermedad e inclusive de muerte. En la actualidad se están empleando nuevas metodologías que permiten una mayor discriminación entre cepas bacterianas de forma más rápida y con una mayor sensibilidad. Se reconoce la necesidad de seguir produciendo nueva información sobre estas nuevas técnicas como lo es el caso de MALDI-TOF MS para la detección de *V. cholerae* no 01 no 139 metodología que representa un gran costo-beneficio y contribuye en la implementación de una vigilancia genómica muy necesaria en la predicción de futuros brotes epidémicos.

Author contributions

AECA = Alejandra Esther Cúneo del Águila

AVA = Armando Vélez Azañero

Conceptualization: AECA

Data curation: AECA

Formal Analysis: AECA

Funding acquisition: AECA

Investigation: AECA, AVA

Methodology: AECA, AVA

Project administration: AECA, AVA

Resources: AECA, AVA

Software: AECA, AVA

Supervision: AVA

Validation: AVA

Visualization: AVA

Writing – original draft: AECA, AVA

Writing – review & editing: AECA, AVA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, S., Cheung, W., Portoni, B., & Janda, J. (1992). Isolation of vibriostatic agent O/129-resistant *Vibrio cholerae* non-O1 from a patient with gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(6), 1598-1599.
- Afanasev, M. V., Mironova, L. V., Basov, E. A., Ostyak, A. S., Kulikalova, E. S., Urbanovich, L. Y., & Balahonov, S. V. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry in the accelerated identification of microorganisms of the *Vibrio* genus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 29(3), 115-122.
- Al-Hilu, S., Al-Mohana, A., & Jaber, Z. (2019). Conventional and molecular detection of *Vibrio cholerae* isolated from environmental water with the prevalence of antibiotic resistance mechanisms. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 1953-1960.
- Ashfaq, M., Al-Ghouti, M., Qiblawey, H., Rodrigues, D., Hu, Y., & Zouari, N. (2019). Isolation, identification and biodiversity of antiscalant degrading seawater bacteria using MALDI-TOF-MS and multivariate analysis. *Science of The Total Environment*, 656, 910-920.
- Baker-Austin, C., Trinanes, J., Gonzalez-Escalona, N., & Martinez-Urtaza, J. (2017). Non-Cholera *Vibrios*: The microbial barometer of climate change. *Trends In Microbiology*, 25(1), 76-84.
- Bhattacharyya F. K. (1977). The agglutination reactions of cholera vibrios. *Japanese journal of medical science & biology*, 30(5), 259-268.
- Bier, N., Schwartz, K., Guerra, B., & Strauch, E. (2015). Survey on antimicrobial resistance patterns in *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 in Germany reveals carbapenemase-producing *Vibrio cholerae* in coastal waters. *Frontiers in microbiology*, 6, 1179.
- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Pazos, M., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calomata, P. (2013). Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis*, 34(6), 877-887.
- Borroto, R. (1997). Ecology of *Vibrio cholerae* serogroup O1 in aquatic environments. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1(1), 328-333.

- Bravo-Fariñas, L., Fernández, A., Ramírez, M. M., Llop, A., Martínez, G., Hernández, R. I., Cabrera, L.E., Morier, L., Fraga, J., Núñez, F. A., & Aguila, A. (2007). Caracterización microbiológica de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(3), 227-233.
- Bronzato, G., Oliva, M., Alvin, M., Pribul, B., Rodrigues, D., & Coelho, S., Coelho, I.S., & Souza, M.M.S. (2018). MALDI-TOF MS as a tool for the identification of *Vibrio alginolyticus* from *Perna perna* mussels (Linnaeus, 1758). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(8), 1511-1517.
- Buller, N.B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. CABI Publishing Wallingford.
- Calder, T., de Souza Santos, M., Attah, V., Klimko, J., Fernandez, J., Salomon, D., Krachler, A. M., & Orth, K. (2014). Structural and regulatory mutations in *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems display variable effects on virulence. *FEMS microbiology letters*, 361(2), 107-114.
- Caro-Castro, J., Mestanza, O., Quino, W., & Gavilán, R. (2020). Diversidad molecular de variantes patogénicas de *Vibrio parahaemolyticus* en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37(2), 270-275.
- Carrascal-Huyhua, M. (2018). *Caracterización y análisis de la variación genética en cepas de Vibrio cholerae Pacini, 1854 (Vibrionales: Vibrionaceae) aislados en Perú, 1991-2016*. (Undergraduate). Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Chart, H. (2012). *Vibrio, Mobiluncus, Gardnerella and Spirillum: Cholera; vaginosis; rat bite fever*. In *Medical Microbiology: Eighteenth (Ed.)*. (pp. 314-323). Elsevier Inc.
- Chen, X., Hou, X., Xiao, M., Zhang, L., Cheng, J., Zhou, M., Huang, J.J., Zhang, J.J., Xu, Y.Ch., & Hsueh, P.R. (2021). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis for the identification of pathogenic microorganisms: a review. *Microorganisms*, 9(7), 1536.
- Cheng, W. C., Jan, I. S., Chen, J. M., Teng, S. H., Teng, L. J., Sheng, W. H., Ko, W. C., & Hsueh, P. R. (2015). Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Vibrio* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1741-1744.
- Cho, Y., Kim, E., Han, S. K., Yang, S. M., Kim, M. J., Kim, H. J., Kim, C. G., Choo, D. W., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2017). Rapid Identification of *Vibrio* Species Isolated from the Southern Coastal Regions of Korea by MALDI-TOF Mass Spectrometry and Comparison of MALDI Sample Preparation Methods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 1593-1601.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 380-407.
- Dalsgaard, A. (1998). The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and Salmonella in aquaculture*. *International Journal of Food Science And Technology*, 33(2), 127-138.
- Deshayes, S., Daurel, C., Cattoir, V., Parienti, J., Quilici, M., & de La Blanchardière, A. (2015). Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia: case report and literature review. *Springerplus*, 4(1), 575.
- Dieckmann, R., Strauch, E., & Alter, T. (2010). Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 199-211.
- Drevinek, M., Dresler, J., Klimentova, J., Pisa, L., & Hubalek, M. (2012). Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 55(1), 40-46.
- Dutta, D., Chowdhury, G., Pazhani, G. P., Guin, S., Dutta, S., Ghosh, S., Rajendran, K., Nandy, R. K., Mukhopadhyay, A. K., Bhattacharya, M. K., Mitra, U., Takeda, Y., Nair, G. B., & Ramamurthy, T. (2013). *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 464-467.
- Ebob, T. (2020). A Review on Diagnostic Methods for the Identification of *Vibrio cholerae*. *Journal Of Advances in Medicine and Medical Research*, 136-164.
- Elmahdi, S., DaSilva, L. V., & Parveen, S. (2016). Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. *Food microbiology*, 57, 128-134.

- Engel, M. F., Muijsken, M. A., Mooi-Kokenberg, E., Kuijper, E. J., & van Westerloo, D. J. (2016). *Vibrio cholerae* non-O1 bacteraemia: description of three cases in the Netherlands and a literature review. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(15), 14.
- Erlor, R., Wichels, A., Heinemeyer, E. A., Hauk, G., Hippelein, M., Reyes, N. T., & Gerdt, G. (2015). VibrioBase: A MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans. *Systematic and applied microbiology*, 38(1), 16–25. doi:
- FAO. (2001). *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods: hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of Campylobacter spp. in broiler chickens and Vibrio spp. in seafood*, WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 23-27 July 2001 (No. WHO/SDE/PHE/FOS/01.4). World Health Organization.
- Farmer, J.J., 1980. Revival of the name *Vibrio vulnificus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 656.
- Faruque, S. M., Albert, M. J., & Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(4), 1301–1314.
- Finkelstein, R.A. (1996). Cholera, *Vibrio cholerae* O1 and O139, and Other Pathogenic Vibrios. In: Baron, S. (ed.). *Medical Microbiology*. 4th Ed. University of Texas.
- Gerdt, G., Erlor, R., & Wichels, A. (2013). *Application of MALDI-TOF MS for environmental Vibrio surveillance programs*. Aquatic Microbial Ecology SAME13, Stresa, Italy, 8 September 2013 - 13 September 2013. Conference (Poster).
- Goering R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, genetics and evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 10(7), 866–875.
- Ha, M., Son, E., & Choi, E. (2016). Application of MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of foodborne pathogen tests to the Korea Food Standard Codex. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 437-444.
- Hazen, T. H., Martinez, R. J., Chen, Y., Lafon, P. C., Garrett, N. M., Parsons, M. B., Bopp, C. A., Sullards, M. C., & Sobczyk, P. A. (2009). Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6745–6756.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L., Gill, S. R., Nelson, K. E., Read, T. D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M. D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleischmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Craig-Venter, J., & Fraser, C. M. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406(6795), 477–483.
- Hollis, D.G., Weaver, R.E., Baker, C.N., & Thornsberry, C. (1976). Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 3, 425 – 431.
- Huget, J. T., Arias, I., & Montoya, Y. (2000). Tipificación Molecular del *Vibrio cholerae* O1 en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 17(1-4), 9-13.
- Huq, A., Haley, B., Taviani, E., Chen, A., Hasan, N., & Colwell, R. (2012). Detection, Isolation, and Identification of *Vibrio cholerae* from the Environment. *Current Protocols in Microbiology*, 26(1), 22875567.
- Islam, M., Zaman, M., Islam, M., Ahmed, N., & Clemens, J. (2020). Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae*. *Vaccine*, 38, A52-A62.
- Kaspar, C. W., & Tamplin, M. L. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2425–2429.
- Lee, R., Rangdale, R., Croci, L., Hervio-Heath, D., & Lozach, S. (2008). Bacterial pathogens in seafood. Improving Seafood Products for the Consumer, In *Improving Seafood Products for the Consumer*. T. Borresen (ed.). (pp. 247-291).
- Li, P., Xin, W., Xia, S., Luo, Y., Chen, Z., & Jin, D. et al. (2018). MALDI-TOF mass spectrometry-based serotyping of *V. parahaemolyticus* isolated from the Zhejiang province of China. *BMC Microbiology*, 18(1), 185.

- Lipp, E., Huq, A., & Colwell, R. (2002). Effects of Global Climate on Infectious Disease: the Cholera Model. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 757-770.
- Liyanage, R., & Lay, J. O. (2006). An introduction to MALDI-ToFMS. Identification of microorganisms by mass spectrometry, In: *Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry, Volume 169*. C. L. Wilkins, & Lay J.O. Jr. (Eds.). (pp. 39-60).
- Malainine, S. M., Moussaoui, W., Prévost, G., Scheffel, J. M., & Mimouni, R. (2013). Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish, sea water and sediments of the Khnifiss lagoon, Morocco, by MALDI-TOF mass spectrometry. *Letters in Applied Microbiology*, 56(5), 379-386.
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22, 35-45.
- Maraki, S., Christidou, A., Anastasaki, M., & Scoulica, E. (2016). Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteremic skin and soft tissue infections. *Infectious Diseases*, 48(3), 171-176.
- Marin, M. A., Thompson, C. C., Freitas, F. S., Fonseca, E. L., Aboderin, A. O., Zailani, S. B., Quartey, N.K.E., Okeke, I.N., & Vicente, A. C. P. (2013). Cholera outbreaks in Nigeria are associated with multidrug resistant atypical El Tor and non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2), e2049.
- Marinello, S., Marini, G., Parisi, G., Gottardello, L., Rossi, L., Besutti, V., & Cattelan, A. M. (2017). *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 bacteraemia associated with pneumonia, Italy 2016. *Infection*, 45(2), 237-240.
- Martinez-Urtaza, J., van Aerle, R., Abanto, M., Haendiges, J., Myers, R., Trinanés, J., Baker-Austin, J.C., & Gonzalez-Escalona, N. (2017). Genomic variation and evolution of *Vibrio parahaemolyticus* ST36 over the course of a transcontinental epidemic expansion. *Mbio*, 8(6), e01425-17.
- Marval, H., & Graü de Marín, C., & Martínez, C., & Muñoz, D. (2012). Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica*, 22(5), 459-467.
- Mougin, J., Flahaut, C., Roquigny, R., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T., & Le Bris, C. (2020). Rapid Identification of *Vibrio* Species of the Harvey Clade Using MALDI-TOF MS Profiling With Main Spectral Profile Database Implemented With an In-House Database: Luvibase. *Frontiers in Microbiology*, 11, 586536.
- Neoh, H., Tan, X., Sapri, H., & Tan, T. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103935.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S. L., Janda, J. M., & Nishibuchi, M. (1997). Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 1965-1971.
- Olivares, F., Domínguez, I., Dabanch, J., Porte, L., Ulloa, M., & Osorio, G. (2019). Bacteriemia por *Vibrio cholerae* no-O1/no-O139 que porta una región homóloga a la isla de patogenicidad VpaI-7. *Revista chilena de infectología*, 36(3), 392-395.
- Pacini F. (1854). Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. Memoria del dott. Filippo Pacini ...: letta alla Societa medico-fisica di Firenze nella seduta del 10 Dicembre 1854. Firenze: Tip. Federigo Bencini, 1854. (Estr. da: Gazzetta medica italiana, Toscana, p 397 e 405). Pag. 1/30.
- Perilla, M. J., Ajello, G., Bopp, C., Elliot, J., Facklam, R., Knapp, J. S. & Dowell, S. (2004). *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Salmonella serotipo Typhi y Vibrio cholerae*. OMS, (pp. 49-67).
- Plaza, N., Castillo, D., Pérez-Reytor, D., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2018). Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 24-33.
- Popović, N. T., Kazazić, S. P., Strunjak-Perović, I., & Čož-Rakovac, R. (2017). Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. *Environmental Research*, 152, 7-16.

- Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R., & Donelli, G. (2015). Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment. In: Belkin, S., & Colwell, R.R. (eds). *Oceans and Health: Pathogens in the marine environment*, Springer. (pp. 217-252).
- Rahaman, M. H., Islam, T., Colwell, R. R., & Alam, M. (2015). Molecular tools in understanding the evolution of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1040.
- Ramamurthy, T., Das, B., Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A. K., & Sack, D. A. (2020). Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*, 38 Suppl 1, A73–A82.
- Rivera, I. N., Lipp, E. K., Gil, A., Choopun, N., Huq, A., & Colwell, R. R. (2003). Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5(7), 599–606.
- Rivera-Chávez, F., & Mekalanos, J. (2019). Cholera toxin promotes pathogen acquisition of host-derived nutrients. *Nature*, 572(7768), 244-248.
- Robles, L. A., García, R. M., & Torres, L. J. (1999). Toxinas de *Vibrio cholerae*. Una revisión. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 46(4), 255-259.
- Rychert, J., Creely, D., Mayo-Smith, L. M., Calderwood, S. B., Ivers, L. C., Ryan, E. T., Boncy, J., Qadri, F., Ahmed, D., Ferraro, M. J., & Harris, J. B. (2015). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Vibrio cholerae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 329–331.
- Sandalakis, V., Goniou, I., Vranakis, I., Chochlak, D., & Psaroulaki, A. (2017). Use of MALDI-TOF mass spectrometry in the battle against bacterial infectious diseases: recent achievements and future perspectives. *Expert Review of Proteomics*, 14(3), 253–267.
- Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2017). Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria?. *Trends in Microbiology*, 25(6), 447-455.
- Schwartz, K., Hammerl, J. A., Göllner, C., & Strauch, E. (2019). Environmental and Clinical Strains of *Vibrio cholerae* Non-O1, Non-O139 From Germany Possess Similar Virulence Gene Profiles. *Frontiers in Microbiology*, 10, 733.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(4), 543–551.
- Seng, P., Rolain, J. M., Fournier, P. E., La Scola, B., Drancourt, M., & Raoult, D. (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in Clinical Microbiology. *Future microbiology*, 5(11), 1733–1754.
- Shin, O. S., Tam, V. C., Suzuki, M., Ritchie, J. M., Bronson, R. T., Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (2011). Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *mBio*, 2(3), e00106–e111.
- Sogawa, K., Watanabe, M., Sato, K., Segawa, S., Ishii, C., Miyabe, A., Murata, S., Saito, T., & Nomura, F. (2011). Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(7), 1905–1911.
- Summer, J., De Paola, A., Osaka, K., Karunasagar, I., Walderhaug, M., Bowers, J. (2001). Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Vibrio* spp. in Seafood. FAO/WHO Activities on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. WHO. (pp. 1–105).
- Taneja, N., Sethuraman, N., Mishra, A., & Mohan, B. (2016). The 2002 Chandigarh cholera outbreak revisited: utility of MALDI-TOF as a molecular epidemiology tool. *Letters in Applied Microbiology*, 62(6), 452–458.
- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. B., & Swings, J. (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5107–5115.
- Tsuchida, S., & Nakayama, T. (2022). MALDI-Based Mass Spectrometry in Clinical Testing: Focus on Bacterial Identification. *Applied Sciences*, 12(6), 2814.

- Ünüvar, S. (2018). Microbial Foodborne Diseases. A. M. Holban & Grumezescu, A.M. (eds.), *Foodborne Diseases*. Elsevier. (pp. 1-31).
- Vezzulli, L., Baker-Austin, C., Kirschner, A., Pruzzo, C., & Martinez-Urtaza, J. (2020). Global emergence of environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* infections linked with climate change: a neglected research field?. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4342–4355.
- Vezzulli, L., Colwell, R. R., & Pruzzo, C. (2013). Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. *Microbial ecology*, 65(4), 817–825.
- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M. G., Brettar, I., Colwell, R. R., & Pruzzo, C. (2016). Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), E5062–E5071.
- Weller, S. A., Stokes, M. G., & Lukaszewski, R. A. (2015). Observations on the Inactivation Efficacy of a MALDI-TOF MS Chemical extraction method on *Bacillus anthracis* vegetative cells and spores. *PloS one*, 10(12), e0143870.
- Wu, J., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Hu, C., & Chen, Y. (2020). Extension and application of a database for the rapid identification of *Vibrio* using MALDI-TOF MS. *Acta Oceanologica Sinica*, 39(10), 140-146.
- Yarbrough, M., Lainhart, W., & Burnham, C. (2017). Identification of *Nocardia*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* using MALDI-TOF MS with the Bruker Biotyper. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(2), 92-97.
- Zamudio, M. L., Meza, A., Bailón, H., Martinez-Urtaza, J., & Campos, J. (2011). Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28, 128-135.
- Zhang, X., Lu, Y., Qian, H., Liu, G., Mei, Y., Jin, F., Xia, W., & Ni, F. (2020). Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* (NOVC) Bacteremia: Case Report and Literature Review, 2015-2019. *Infection and drug resistance*, 13, 1009–1016.
- Zúñiga CIR, Caro LJ. (2014). *Vibrio vulnificus* una bacteria al acecho en las playas. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 27-28(110), 532-534.

Received September 13, 2022.

Accepted November 27, 2022.