



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones
Científicas
Cuba

Payne Delíz, Gardenia; Ledón Pérez, Talena; Fando Calzada, Rafael
Modelación in vitro del desempeño ambiental de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638
Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 48, núm. 2, mayo-septiembre, 2017, pp. 1-11
Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181250961001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Modelación *in vitro* del desempeño ambiental de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638

Gardenia Payne Delíz*, Talena Ledón Pérez, Rafael Fando Calzada.

Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, AP 6414, Ciudad de la Habana, Cuba. gardenia.payne@cnic.edu.cu

Recibido: 7 de noviembre de 2017.

Aceptado: 30 de diciembre de 2017.

Palabras clave: vacuna de cólera, *Vibrio cholerae*, cepas atenuadas, persistencia ambiental

Key words: cholera vaccine, *Vibrio cholerae*, attenuated strains, environmental persistence.

RESUMEN. La cepa atenuada *Vibrio cholerae* 638 (O1, El Tor, Ogawa) es el ingrediente activo del candidato vacunal vivo oral CV638, producto bien tolerado e inmunogénico en varios estudios con voluntarios sanos. La administración del agente biológico vivo atenuado implica su excreción en las heces de los receptores de la vacuna. Luego, en el entorno regulatorio, existe preocupación por su posible impacto ambiental, así como por la posibilidad de reversión a la virulencia de las cepas liberadas. Este trabajo constituye un acercamiento experimental al posible desempeño de dicha cepa en el ambiente. Se evaluó la sobrevivencia de VC638 empleando agua de diferentes fuentes y distintas disponibilidades nutricionales. Los resultados sugieren que esta cepa no tiene ventajas con respecto a su parental salvaje para sobrevivir en condiciones óptimas de crecimiento ni ante un déficit de nutrientes. También se determinó la susceptibilidad de la cepa a condiciones de estrés que incluyeron el dodecil sulfato de sodio y un ambiente hiperosmótico. La cepa vacunal no posee propiedades que favorezcan su desempeño ante estos factores de estrés. Igualmente, se probó su resistencia a la transmisión génica horizontal, concluyéndose que VC638, al igual que las cepas toxigénicas de circulación actual en el Caribe, es resistente a la transformación natural en presencia de quitina. La frecuencia de transformación de VC638 es 10^3 veces menor que la de su parental toxigénico. Finalmente, VC638 no mostró indicios de posibles ventajas para competir y sobrevivir en ambientes naturales.

ABSTRACT. The attenuated strain *Vibrio cholerae* 638 (O1, El Tor, Ogawa) is the active ingredient of oral vaccine candidate CV638, product well tolerated and immunogenic in several studies with healthy volunteers. The administration of live attenuated biological agent involves its excretion in the feces of vaccine recipients. Then in the regulatory context, there is concern about its potential environmental impact and the possibility of reversion to virulence. This paper is an experimental approach to the possible performance of such strain on the environment. It was assessed the survival of VC638 using water from different sources in several laboratory conditions. The results suggest that this strain has no advantages over its wild type parental strain to survive in optimum or minimal growth conditions. Strain susceptibility to stress conditions that included sodium dodecyl sulfate and hyperosmotic environment was also determined. The results suggest that the vaccine strain does not possess properties that favor its performance against these agents. In addition, it was tested their resistance to horizontal gene transmission, concluding that VC638, as toxigenic strains currently circulating in the Caribbean, is resistant to natural transformation in the presence of chitin. The transformation frequency of VC638 is 10^3 times lower than that of its toxigenic parental strain. Finally, VC 638 showed no signs of possible advantages to compete and survive in natural environments.

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad diarreica severa provocada por la bacteria Gram negativa *Vibrio cholerae*. Fuera del intestino humano, esta bacteria es un miembro autóctono de ambientes acuáticos como lagos, ríos, estuarios y el océano que sirve como su principal depósito natural. ⁽¹⁾ En la actualidad, continúa siendo un grave problema de salud a nivel mundial que afecta fundamentalmente a países en desarrollo. ⁽²⁾

La incidencia de los brotes de cólera está muy vinculada con factores ambientales y ecológicos que son, a su vez, influenciados por las variaciones del clima a nivel global. ^(3, 4) La persistencia del agente causal del cólera depende de su capacidad para adaptarse y desarrollar estrategias de supervivencia como son la formación de biopelículas, la adquisición de fenotipo rugoso o alcanzar el estado viable no cultivable (VNC). Por otra parte, se ha descrito que *V. cholerae* puede adherirse a los caparazones de algunos crustáceos y coloniza las superficies de algas, fitoplancton,

copépodos y raíces de plantas acuáticas, empleando la quitina presente en estos sustratos como fuente de carbono y nitrógeno. ^(5, 6) Se conoce que dicho polisacárido, además, induce el estado de competencia natural, en el cual las bacterias pueden adquirir ADN del medio ambiente por transformación natural y recombinación. ⁽⁷⁾ Dicho estado fisiológico condiciona un mecanismo de transferencia horizontal de genes (TGH) que permite a las bacterias adaptarse a nuevos nichos y difundir sus determinantes antigénicos, como casetes de resistencia a antibióticos o islas de patogenicidad. ⁽⁸⁾

El análisis de la estructura de la población de los hábitats acuáticos revela que estos ecosistemas contienen múltiples cepas, especies microbianas, altas concentraciones de fagos y ADN soluble. ⁽⁹⁾ Estas características, combinadas con los diferentes mecanismos de TGH, complejiza el contexto en el que se prevé el uso de una cepa viva atenuada como variante vacunal. ⁽¹⁰⁾

Cuba, a raíz de la epidemia que ocurrió en Haití a finales del 2010, revitalizó la vigilancia para el diagnóstico oportuno de la enfermedad. En 2012 se detectó un brote causado por vibriones del serogrupo O1 en la provincia Granma y se confirmaron 701 casos en todo el país hasta la semana epidemiológica 8 del 2014. ⁽¹¹⁾ A finales de 2015 las autoridades de salud confirmaron 65 casos de cólera debido a *Vibrio cholerae* O1, serotipo *Ogawa*. ⁽¹²⁾ Aunque gracias a la organización de nuestro sistema de salud y su enfoque intersectorial se ha logrado controlar la enfermedad de manera que no alcance una magnitud epidémica, se debe continuar el perfeccionamiento del control sanitario internacional y los sistemas de vigilancia. ⁽¹³⁾ No se ha descartado la posible evolución a cólera endémico, por cuanto la causa fundamental de la incidencia de dicha enfermedad es la falta de condiciones higiénicas asociada a la infraestructura sanitaria dañada y ese aspecto no tiene solución inmediata. ⁽¹⁴⁾ Además, las amplias relaciones de colaboración de Cuba con el mundo, el desarrollo del turismo y la cercanía geográfica a Haití, hace que el riesgo epidemiológico en Cuba se incremente, ⁽¹⁵⁾ es por ello que obtener una vacuna efectiva y segura contra esta patología resulta de gran importancia.

Desde 1992, en Cuba se han venido realizando grandes esfuerzos para el desarrollo de una vacuna eficaz contra el cólera. Como resultado de este proyecto investigadores del Centro Nacional de Investigaciones Científicas han evaluado diferentes cepas candidatas vacunales vivas atenuadas para inmunización oral. ⁽¹⁶⁾ La cepa atenuada *V. cholerae* 638 (VC638) es el ingrediente activo del candidato vacunal CV638. ⁽¹⁷⁾ Esta cepa procede de una segunda generación de cepas modificadas genéticamente mediante el empleo de vectores suicidas y técnicas de intercambio alélico. ⁽¹⁸⁾ A partir de la supresión del profago CTX ϕ , portador de los genes de la toxina del cólera (*ctxAB*), en la cepa virulenta C7258 *V. cholerae* O1 El Tor *Ogawa*, se produjo la cepa no toxigénica de *V. cholerae* 81. En una etapa posterior, en dicha cepa, se reemplazó el gen *hapA*, que codifica la principal proteasa soluble de *V. cholerae*, por un alelo inactivado mediante la inserción del gen de la endoglucanasa A (*celA*) de *Clostridium thermocellum*. ⁽¹⁹⁾ Este gen heterólogo es un marcador adecuado para el desarrollo de vacunas vivas contra el cólera, ya que su presencia origina cepas que no expresan la hemaglutinina proteasa y poseen la actividad endoglucanasa, la cual permite distinguir a *V. cholerae* 638 de otros vibriones por la aparición de un halo de degradación en placas indicadoras de carboximetilcelulosa teñidas con rojo congo. La distinción fácil e inequívoca de la bacteria marcada facilita los estudios de campo. ^(20, 21)

V. cholerae 81 y 638 colonizan bien en ratones y son inmunogénicas en conejos cuando se administran por vía intraduodenal. ⁽²²⁾ Sin embargo, no existen datos publicados sobre la seguridad y la inmunogenicidad de *V. cholerae* 81. ⁽¹⁹⁾ El CV638, se encuentra en fase de desarrollo clínico y ha resultado seguro e inmunogénico en población adulta ⁽¹⁶⁾ y pediátrica con edades entre 5 y 17 años. ⁽²³⁾

La administración del CV638, implica su excreción en las heces de los receptores de la cepa atenuada viva VC638, por esta razón en el entorno regulador se requiere valorar el posible impacto ambiental de la cepa vacunal. En particular, resulta de interés explorar las posibilidades de persistencia en ecosistemas acuáticos de la cepa liberada; así como su posible reversión a la virulencia por readquisición de los genes de la toxina colérica, un evento que puede ocurrir en ese entorno, por mecanismos de TGH. ⁽²⁴⁾

El objetivo de este estudio es evaluar el desempeño *in vitro* de la cepa vacunal VC638, respecto a sus parentales, la cepa toxigénica C7258 y el mutante atoxigénico 81, en cuanto a la persistencia en ambientes acuáticos simulados, así como la capacidad de transformación natural en presencia de quitina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Cepas

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo y su procedencia se detallan en la Tabla 1. Todas las cepas utilizadas corresponden a *V. cholerae* Serogrupo O1, Biotipo El Tor. Se utilizaron, además, otras dos cepas derivadas C7258 para extracción del ADN genómico, que se emplea en los experimentos de transformación natural: la cepa C7258-K que contiene al gen de resistencia a la Kan en el locus VC2215::2216 (genes involucrados en la tolerancia al cobre) y la cepa 72CTK49 que posee el gen de resistencia al antibiótico en el entorno génico del operón *ctxAB*.

Tabla 1. Cepas de *V. cholerae* empleadas en el estudio.

Cepas	Características	Procedencia*
C7258	Serotipo O1, biotipo El Tor, Ogawa	Perú, 1991
81	C7258 Δ (<i>cepOrfU ace zotctxAB</i>).	CNIC, 1995
638	81 Δ (<i>cepOrfU ace zot ctxAB</i>) <i>hap::celA</i>	CNIC, 1996
KHT46	C6706 (Serotipo O1, biotipo El Tor, Inaba) Δ <i>mshA</i>	E.U.A., 1996

*referido por Silva y cols, 2005 ⁽²⁵⁾

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: LB-agar (triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y Bacto agar 15 g/L, pH 7.0); TSB (triptona 17 g/L, peptona 3 g/L, K₂HPO₄ 2.5 g/L, NaCl 5 g/L) suplementados con glucosa al 0.4 %; Agua de mar simulada (NaCl 27.3 g/L, Mg₂SO₄ 13.6 g/L, CaCl₂ 1.5 g/L, KCl 0.8 g/L, NaHCO₃ 0.3 g/L, Na₂B₄O₇ 0.005 g/L, LiCl 0.001 g/L, pH 7.4), y Agua peptona alcalina (NaCl 1%, peptona 1%, pH 8.5), como medio de enriquecimiento para *V. cholerae*. Los medios de cultivo se complementaron, cuando fue necesario, con kanamicina (Kan) 50mg/ml y polimixina B (polB) 20 mg/ml.

Métodos

Persistencia en ambientes naturales simulados

Se evaluó la capacidad de sobrevivencia de la cepa toxigénica C7258 y la cepa atenuada VC638 en ambientes naturales simulados. Se utilizaron tres condiciones experimentales: agua de mar simulada suplementada con exoesqueleto de langosta, que contiene quitina y agua de manantial (ambiente de agua dulce) con y sin el suplemento de carbono. Se inoculó una colonia de cada cepa a evaluar en 5ml de caldo LB y se incubó durante toda la noche en zaranda a 37°C. Las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con solución salina al 0,85%. Luego se midió y ajustó la DO_{600nm} a 0,5-0,7 en un Biofotómetro Eppendorf. De la suspensión de células lavadas de cada cepa se tomaron 100µl que se mezclaron con 50ml del medio de cultivo de interés. Se incubó a 30°C de forma estática durante 90 días. Se determinó el número de viables en placas de LB-Agar suplementadas con polB. Estos valores se determinaron cada 12 horas los primeros 3 días, luego se realizó un conteo diario hasta el día 9 y cada 7 días hasta completar los 90 días.

Inducción del fenotipo rugoso

La inducción de fenotipo rugoso se realizó con modificaciones al método de Wai y cols, 1998. ⁽²⁶⁾ Los experimentos se efectuaron a partir de colonias frescas en placas con LB-agar de las cepas de *V. cholerae* C7258, 81 y VC638 incubadas durante 16-20 horas a 37°C. Posteriormente se transfirieron colonias aisladas a tubos de cultivo que contenían 5ml de caldo LB y se mantuvieron a 200 rpm por 5 horas a 37°C. Se empleó 5µl de cada cultivo para inocular tubos con 5 ml de agua peptona alcalina (APA) y se incubaron a 37°C durante 30 días. Se inocularon 12 tubos por cada cepa. Al cabo de tiempos periódicos se realizaron conteos de viables mediante siembra en medio apropiado. En cada caso se observó la morfología y se anotó la cantidad de colonias con morfología lisa y rugosa de cada cepa.

Susceptibilidad a alta salinidad

La evaluación de la susceptibilidad a alta salinidad de las colonias con morfología rugosa, consistió en exponerlas a una solución de 2,5M NaCl; para ello se resuspendieron colonias aisladas en 1,5µl de caldo LB de cada cepa y se ajustó la DO a 1. El volumen de la suspensión celular se dividió y se utilizaron 500µl, que luego de centrifugados se resuspendieron en 500µl de Solución Salina 0,85%. Se tomaron muestras para microconteo a los tiempos 0 y 60 minutos y se consideró como el control del experimento. La osmotolerancia se ensayó con los restantes 500µl de estas suspensiones celulares. Se centrifugaron, de igual modo y se mezclaron en 500µl de 2,5M NaCl. Las muestras para conteo de viables se tomaron a los tiempos 0, 1, 30 y 60 minutos.

Susceptibilidad de cepas de *V. cholerae* a SDS

Para evaluar la susceptibilidad al SDS se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto en placas de poliestireno de 24 pozos a las que se añadió 1ml de TSB-glucosa (0,4%) por pozo y concentraciones crecientes del agente estresante desde 0,05% hasta 0,5%. ⁽²⁴⁾ Las cepas se crecieron en el mismo medio durante toda la noche a 37°C y para inocular se realizó una dilución 1:100 de cada cultivo. Como control se empleó un pozo por cada cepa al cual no se le añadió el agente. Cada 1 hora se realizó la lectura de la placa a 630 nm en un lector de placas Dialab. Se consideró como CMI aquella concentración en la que no se observó crecimiento bacteriano.

Transformación natural sobre una superficie de caparazón de langosta

Se evaluó la potencialidad de la cepa VC638 para adquirir *in vitro*, por transformación natural, fragmentos de ADN solubles presentes en el medio. El procedimiento de transformación natural se realizó de acuerdo con el protocolo

propuesto por Meibom y cols, 2005,⁽⁹⁾ con algunas modificaciones. Para la realización del experimento, a los frascos previamente esterilizados que contenían 1ml de agua de mar simulada y alrededor de 10^7 UFC de las cepas de *V. cholerae* se le añadieron 80mg de fragmentos de caparazón de langosta. A las 24 horas de incubación a 30°C de forma estática se adicionaron 2µg de ADN genómico conteniendo el gen que confiere resistencia a la Kan. El ADN genómico se purificó a partir de las cepas C7258-K y la cepa 72CTK49. La selección positiva de los transformantes se realizó por extensión en placas de LBK. La frecuencia de transformación se estimó como el cociente entre las UFC resistentes a Kan y el total de UFC que crecieron en LB sin antibiótico (LBK/LB).

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico *GradPrism*, versión 5.0. El nivel de significación estadística se fijó en 0.05 % para todas las comparaciones. Los estadígrafos utilizados en cada caso se declaran convenientemente durante la exposición de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Persistencia en ambientes naturales simulados

En agua de manantial sin suplemento de quitina, condición representativa de los ambientes con déficit de nutrientes, las cuentas de VC638 cultivables caen de 10^5 a $< 10^1$ UFC/ml en los primeros tres días y se detecta intermitente hasta el día 30 de incubación (1-3 UFC/ml). Tiempo a partir del cual no se detectan viables de VC638 por crecimiento en medio sólido. Por otra parte, la cepa toxigénica C7258 mantuvo microconteos dos veces superiores con fluctuaciones por puntos muestrales. De igual forma no se pudo recuperar tras la pérdida de la cultivabilidad, pasados los 30 días (Fig. 1A). La no cultivabilidad de los microorganismos en estudio se presenta en la mencionada figura, como el límite de detección del experimento.

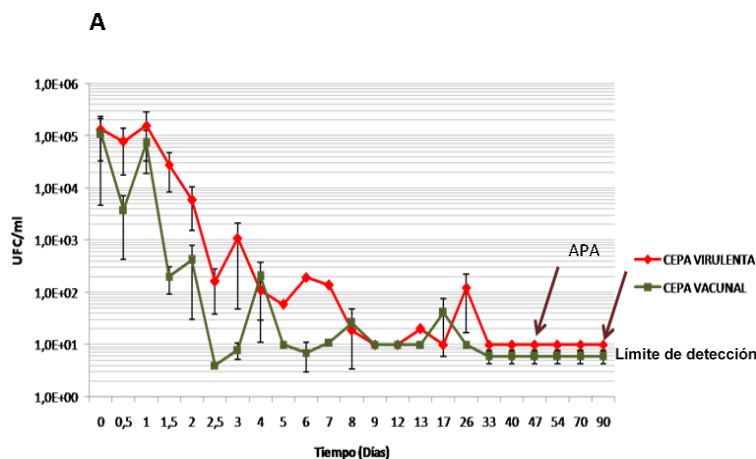


Fig. 1. Supervivencia in vitro de la cepa virulenta C7258 y la cepa atenuada VC638 en ambientes simulados. Se utilizaron tres condiciones experimentales: **A)** agua de manantial

V. cholerae ante condiciones ambientales de estrés, que le impiden mantener el crecimiento normal, puede entrar en un estado de dormancia conocido como estado viable no cultivable (VNC).⁽²⁷⁻²⁹⁾ En este estudio la escasa disponibilidad de nutrientes (inanición) pudo desencadenar esta estrategia de supervivencia. En esta condición fisiológica las bacterias exhiben la función metabólica detectable, pero no son cultivables por métodos de cultivo convencionales.⁽³⁰⁾ Esta imposibilidad de cultivo de las células de este microorganismo, que ha sido asociada con la capacidad de agregarse en biopelículas, incluso después de haber estado no cultivable durante más de un año, es un aspecto relevante en la ecología de *V. cholerae*. Varios estudios han hecho mención a su importancia en las epidemias estacionales de cólera.^(29, 31, 32) Para la detección de células viables en este estado se han descrito procedimientos que van desde el uso de las tinciones diferenciales y el recuento microscópico directo,^(33, 34) hasta métodos moleculares que detectan la expresión génica, como son: la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción (RT-PCR) que indica la presencia de ARNm⁽³⁵⁾, el ensayo que utiliza p-iodonitrotetrazolium violeta (INT) para identificar actividad del sistema de transporte de electrones,⁽³⁶⁾ mientras que el ensayo de la luciferasa se puede utilizar para estimar la generación de ATP en las células viables.⁽³⁷⁾

El primer paso para la detección de células VNC es la estimación de las células cultivables restantes en la muestra mediante una técnica de recuento en placa convencional.⁽³⁸⁾ Para esto, los cultivos de las cepas C7258 y VC638 se enriquecieron con agua peptona alcalina (APA) durante 12 horas a 37°C. Se subcultivaron en TCBS agar (tiosulfato-citrato-sales biliares, Oxoid) y se incubaron 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación no se observó crecimiento microbiano en dichas placas. El conocimiento del estado VNC es hasta la fecha extremadamente limitado. Esto se debe principalmente, a las complicaciones en las condiciones de inducción *in vitro*.⁽³⁹⁾ No se

descarta la posibilidad de que en estos cultivos existan células VNC, pero para su comprobación será necesario continuar con el procedimiento de detección poniendo en práctica otras técnicas descritas en la literatura. No obstante, el comportamiento de la cepa VC638, en las condiciones ensayadas, no se distingue del de su parental toxigénico C7258.

En la segunda condición ensayada se suplementó el agua de manantial con exoesqueleto de langosta que contiene quitina, la que puede ser empleada como fuente de carbono y nitrógeno por *V. cholerae*, como se mencionó anteriormente. Esta condición permite la multiplicación de este microorganismo en agua dulce, donde sus requerimientos de salinidad pueden ser satisfechos por una adecuada concentración de nutrientes.⁽⁴⁰⁾ En este caso, tanto la cepa toxigénica como la cepa atenuada mantuvieron microconteos similares, aunque cabe destacar que aquellos correspondientes a la cepa VC638 no fueron superiores a su contraparte virulenta (Fig.1B).

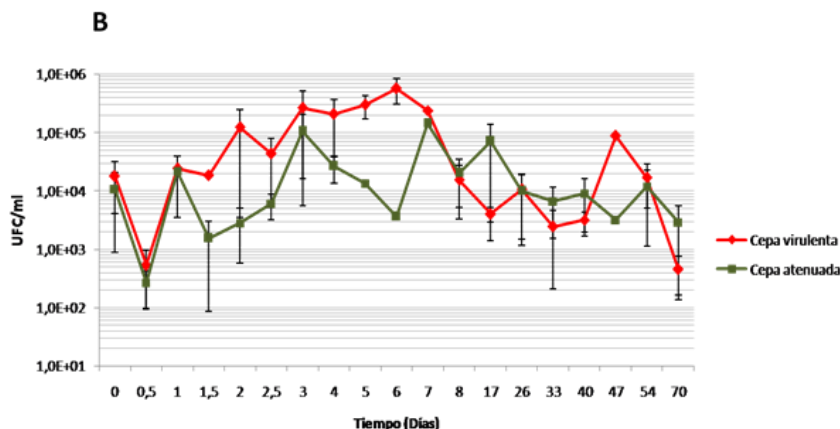


Fig. 1 B. Supervivencia *in vitro* de la cepa virulenta C7258 y la cepa atenuada VC638 en ambientes simulados. Se utilizaron tres condiciones experimentales: **B)** agua de manantial suplementada con exoesqueleto de langosta.

La condición de crecimiento en aguas salobres se modeló adicionando al agua de mar simulada fragmentos de exoesqueleto de langosta. En estas condiciones los microconteos para la cepa virulenta aumentaron de 10³ hasta cerca de 10⁷ UFC/ml en 7 días. La cepa vacunal se mantuvo en alrededor de 10⁴ UFC/ml hasta cerca de los 30 días de muestreo, tiempo en el que ambas cepas disminuyeron sus microconteos (Fig. 1C). Este resultado pudiera indicar que VC638 tiene alguna limitación para emplear la quitina como fuente de carbono y crecer a expensas de ese único nutriente. Indicio que deberá ser estudiado en experimentos subsiguientes, donde se compare la velocidad de crecimiento de VC638 vs C7258.

En las condiciones *in vitro* evaluadas VC638 no mostró un mejor desempeño que su parental toxigénico C7258, hecho que sugiere que la cepa vacunal no posee ventajas *in vitro* sobre otras cepas de *V. cholerae* para persistir en el ambiente, luego de su liberación. Será necesario corroborar este comportamiento, comparando el desempeño de la cepa VC638 con otras cepas ambientales de *V. cholerae* aisladas en nuestro país, así como en experimentos de competencia.^(41, 42)

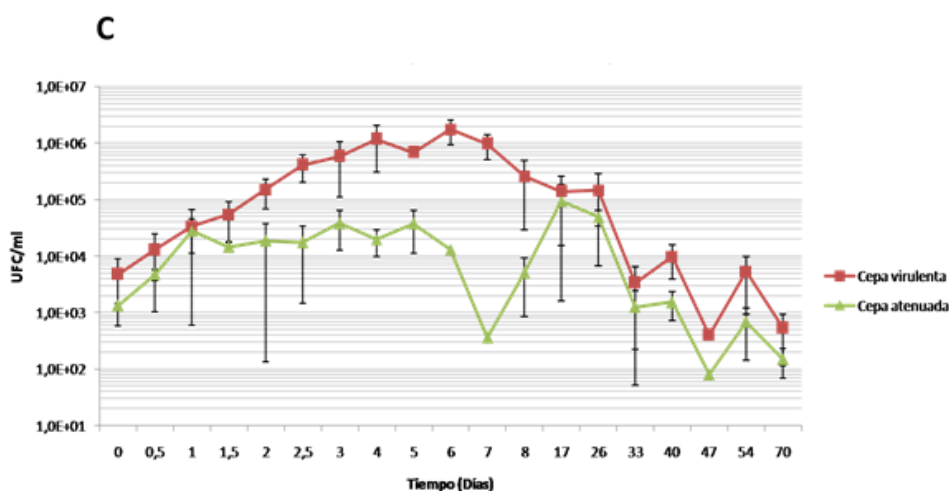


Fig. 1. Supervivencia *in vitro* de la cepa virulenta C7258 y la cepa atenuada VC638 en ambientes simulados. Se utilizaron tres condiciones experimentales: **C)** agua de mar simulada enriquecida con exoesqueleto de langosta. Se inoculó 50ml de cada medio de interés con una suspensión celular de cada cepa ajustada a DO_{600nm} entre 0,5 y 0,7. Se mantuvo a 30°C de forma estática durante 90 días y la presencia de viables se determinó por cultivo en medio sólido. Las barras de error indican la desviación estándar en los puntos muestrales.

Inducción del fenotipo rugoso

V. cholerae en respuesta a tensiones medioambientales tiene la capacidad de someterse a un evento de variación de fase que resulta en la generación de dos variantes de colonias morfológicamente distintas, muy diferentes a nivel fenotípico. La hipótesis de cambiar entre los morfotipos de colonias lisas y rugosas fue propuesta por Balteanu en 1926 y por White en 1938 como una capacidad de la bacteria para contribuir a su supervivencia y persistencia ambiental.⁽⁴³⁾ El fenotipo rugoso le confiere a *V. cholerae* una alta resistencia a agentes como el cloro, el peróxido de hidrógeno, la actividad bactericida del suero mediada por el complemento y otras condiciones de estrés oxidativo y osmótico.⁽⁴⁴⁾

Para este estudio, que pretende simular el posible desempeño ambiental de la cepa vacunal VC638, resultó interesante conocer si dicha cepa era capaz de adquirir el mencionado fenotipo y con qué diferencia de tiempo en comparación con otras cepas de *V. cholerae*. Se favoreció la aparición de colonias con morfología rugosa en las cepas C7258, 81 y VC638 por medio del cultivo estático en agua peptona alcalina a 37°C por 30 días.

Las tres cepas mostraron la habilidad de expresar el fenotipo rugoso. A partir del séptimo día de incubación, solo la cepa 81 presentó colonias rugosas. No se llegó a identificar el fenotipo rugoso típico de *V. cholerae* hasta el día 10 para C7258 y hasta el día 14 post-inoculación para la cepa VC638. Hacia el final del experimento todas las cepas exhibieron un fenotipo "estresado" en el que las colonias se observaron opacas, con bordes regulares y con corola en el centro (resultados no mostrados).

La presencia de variantes fenotípicas también se ha informado en *Vibrio vulnificus*⁽⁴⁵⁾ y *Vibrio parahaemolyticus*, indicando que este proceso es común entre las especies de *Vibrio* de importancia clínica. Estudios previos han demostrado que el fenotipo rugoso observado en *V. cholerae* está relacionado con la producción del exopolisacárido VPS, codificado por un grupo de genes contenidos en el operón de polisacárido *vps*, el cual promueve además la formación de biopelículas⁽⁴⁶⁾. La expresión de este operón está mediada por proteínas codificadas por genes situados en las regiones *vpsI* (*vpsA-K*) y *vpsII* (*vpsL-Q*).⁽⁴⁷⁾ La variante rugosa de *V. cholerae* forma colonias onduladas y biopelículas bien desarrolladas. Aumentos en la producción de cantidades excesivas de VPS debido a la sobreexpresión de los operones *vps I* y *II* es en gran parte responsable de estos fenotipos.⁽⁴⁸⁾ Las mutaciones en cualquiera de los genes *vps* causan morfología colonial lisa y reducción de la capacidad para formar biopelículas.⁽⁴³⁾

De acuerdo a las observaciones experimentales, estas cepas no tienen afectaciones en el operón *vps*, que les proporciona el cambio fenotípico para una mejor persistencia en un ambiente heterogéneo y variable. Es de esperar entonces, que no tengan limitaciones para formar biopelículas. En lo que respecta a VC638, los resultados no sugieren que tenga alguna ventaja selectiva respecto a sus parentales.

Evaluación de la susceptibilidad a alta salinidad

La prevalencia *V. cholerae* en su hábitat natural puede estar influida por parámetros fisicoquímicos básicos del medio ambiente.⁽⁴⁹⁾ Estudios realizados en regiones costeras y de estuarios de diferentes partes del mundo han demostrado que las variaciones en las concentraciones de sal del agua juegan un rol importante en la aparición de *V. cholerae* en el medio ambiente.^(50, 51) Por su capacidad distintiva dentro del género *Vibrio spp* de persistir e incluso crecer, aunque lentamente, en ambientes con concentraciones mínimas de sal siempre en presencia de sodio, *V. cholerae* es considerado un microorganismo halotolerante o halófilo versátil. Sin embargo, varios autores coinciden en reportar la salinidad óptima para el crecimiento de *V. cholerae* en un rango que oscila entre 5 y 25 g/L. Con la presencia de suficiente materia orgánica disuelta, también puede crecer bien en salinidades cerca de 45 g/L.^(3, 50, 52) Debido a ello, esta bacteria se adapta bien a las condiciones de agua dulce y salobre de las zonas endémicas.

Teniendo en cuenta estos elementos, se efectuó un ensayo con elevadas concentraciones de NaCl para evaluar la capacidad de la cepa vacunal VC638, de tolerar el estrés salino. Su comportamiento se comparó con la cepa atoxigénica *V. cholerae* 81. Se expusieron al agente estresante alrededor de 10^7 UFC/mL de cada cepa y se controló la viabilidad por conteo en placa a los 0, 30 y 60 minutos. En ambos casos se detectó una reducción de las células viables en el tiempo, aunque las cepas, en sus variantes con morfología rugosa, mantuvieron los conteos de viables entre 10^6 y 10^7 UFC/ml (Fig. 2).

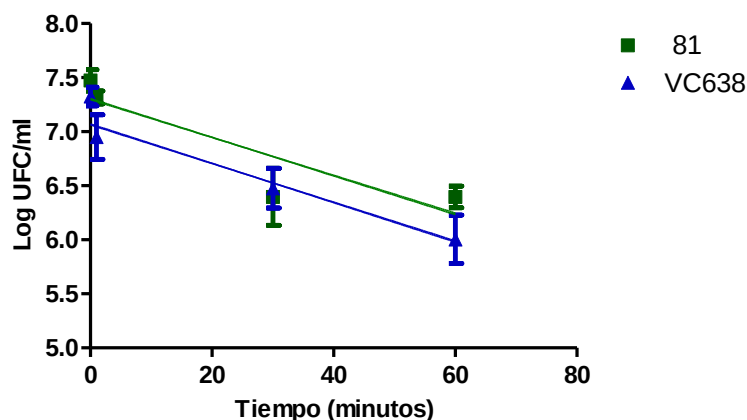


Fig. 2. Evaluación de la resistencia a altas concentraciones salinas de cepas de *V. cholerae* O1. Alrededor de 10^7 UFC/ml de las cepas VC638 y 81 se expusieron a NaCl 2,5 M. Los tiempos para análisis de la viabilidad por microconteo fueron 0; 1; 30 y 60. Ambas cepas mantuvieron los conteos de viables entre 10^6 y 10^7 UFC/ml, sin diferencias estadísticas entre ellas (Prueba F, $F=2,277$; $Dfn=1$; $Dfd=35$; $p=0,1403$). Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Al finalizar el experimento fue evidente para ambas cepas la caída de la cantidad de UFC. No obstante, los conteos para la cepa VC638 fueron inferiores solo en un orden logarítmico en comparación con las UFC de 81. Para comparar el desempeño de ambas cepas se plotó el Log UFC/ml contra el tiempo y se obtuvo, con una probabilidad razonable, una recta cuya pendiente indica la velocidad de inactivación. El análisis estadístico comparativo de las pendientes de las rectas obtenidas indica que no existen diferencias significativas entre estas (Prueba F, $F=2,277$; Dfn =1; Dfd=35; $p = 0,1403$). Por cuanto, VC638 es semejante a su parental directo, la cepa 81. Lo que sugiere que, en el proceso de construcción de la cepa vacunal, esta no obtuvo determinantes nuevos que favorecieran su resistencia a agentes estresantes como la alta salinidad.

Susceptibilidad al SDS

La susceptibilidad al detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) se evaluó usando concentraciones crecientes del agente estresante desde 0,05% hasta 0,5%. Se observó el comportamiento de las cepas VC638 y C7258 en presencia y en ausencia del detergente SDS en medio TSB suplementado con glucosa 0,4%. Se detectó una completa inhibición del crecimiento en la cepa vacunal con 0,05% de SDS (mínima concentración ensayada), mientras que C7258 a esa concentración continúa creciendo (Fig. 3). La Concentración Mínima Inhibitoria del SDS en la cepa VC638 *in vitro* es dos veces menor que la de su parental toxigénico C7258, por lo que en presencia de este compuesto su sobrevivencia en el ambiente pudiera estar afectada.

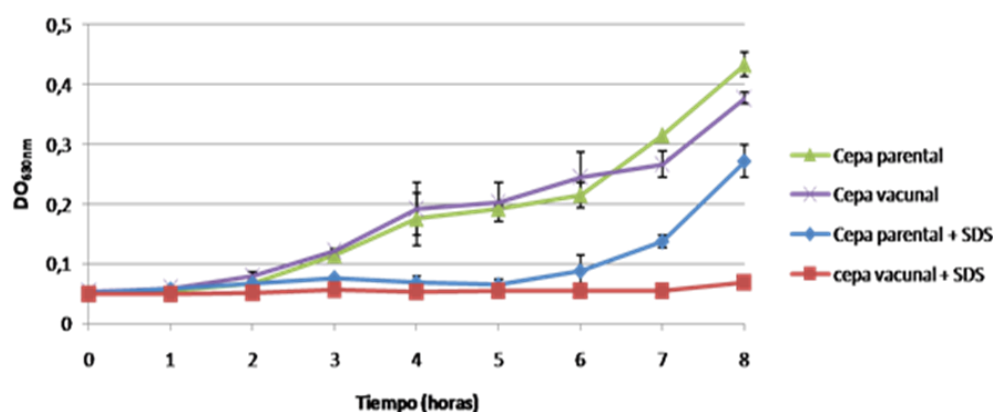


Fig. 3. Evaluación de la susceptibilidad al SDS 0,05% de las cepas de *V. cholerae* C7258 (cepa parental) y VC638 (cepa vacunal) en medio TSB glucosa 0,4%. El ensayo se realizó en placas de 24 pozos de poliestireno. La evaluación de la susceptibilidad se realizó a través de la lectura de las muestras en un lector de placas Dialab a DO 630 nm cada una hora. Se detectó una completa inhibición del crecimiento en la cepa vacunal con 0,05% de SDS. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Esta característica pudiera estar relacionada con el patrón de proteínas de membrana externa (OMP, del inglés *outer membrane protein*) debido a que como la mayoría de las bacterias Gram-negativas, *V. cholerae*, regula la tasa de difusión de moléculas pequeñas a través de su membrana externa por la modulación de la producción de las porinas, específicamente OmpT y OmpU.⁽⁵³⁾ La producción de OmpT se asocia con el aumento de la sensibilidad a la bilis,⁽⁵⁴⁾ mientras que la producción de OmpU ha sido implicada en la resistencia a péptidos antimicrobianos, ácidos orgánicos, y detergentes aniónicos de la bilis y el SDS.⁽⁵⁵⁾ La cepa VC638 posee una mutación en el gen *toxR* que determina un patrón distintivo de OMP, caracterizado por la expresión casi exclusiva de OmpT. De tal manera, el aumento en la susceptibilidad a los detergentes como el SDS en la cepa vacunal respecto a su parental pudiera estar relacionada con la reducción en la expresión de la porina OmpU.

El SDS es un compuesto tensoactivo aniónico, similar a otros detergentes de uso doméstico.⁽⁵⁶⁾ De acuerdo con los resultados obtenidos se pudiera predecir para VC638 una susceptibilidad igual o inferior a la de su progenitor ante otras sustancias de naturaleza parecida.

Transformación natural sobre una superficie de caparazón de langosta

En una primera instancia, se analizó la capacidad de transformación natural de la cepa VC638 en comparación con su parental C7258 empleando el exoesqueleto de langosta como fuente de quitina, de acuerdo con Meibom y cols, 2005 demostraron que *V. cholerae* en presencia de quitina se hace competente y es capaz de adquirir ADN soluble presente en el medio e incorporar ese nuevo ADN a su cromosoma, mediante mecanismos de recombinación homóloga. Teniendo en cuenta que la cepa VC638 no produce la fimbria hemaglutinina sensible a manosa (MSHA),⁽²⁵⁾ se decidió evaluar, además, su desempeño en comparación con la cepa KHT46, mutante del gen *mshA*, que codifica la subunidad principal de dicha pilina. Los resultados de tres experimentos independientes demostraron que la frecuencia de transformación de las cepas C7258 y KHT46 es de 10^2 a 10^3 veces mayor que la de la cepa VC638 (Fig. 4A).

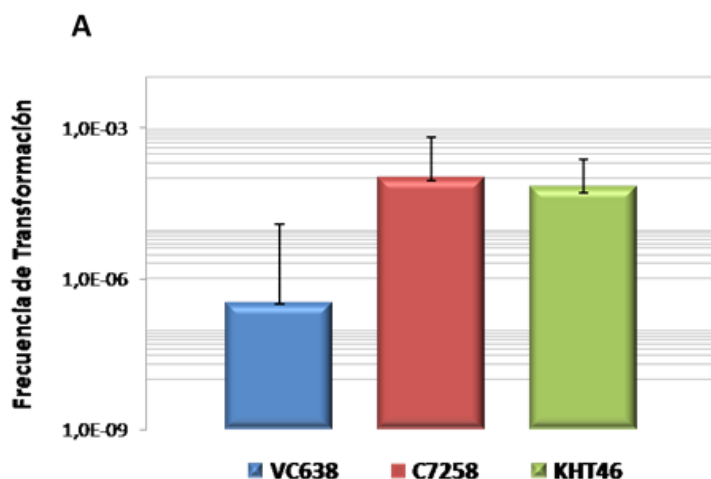


Fig. 4. Transformación natural de cepas de *V. cholerae* sobre una superficie de exoesqueleto de langosta. Se determinó la frecuencia de transformación inducida por quitina empleando **A)** ADN que posee insertado un gen que confiere resistencia a kanamicina (Kan^R) en el gen VC2215::2216.

Esa diferencia resultó estadísticamente significativa en ambos casos (Prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$; Prueba de Dunn *a posteriori*; $p < 0,01$ y $p < 0,05$; respectivamente). En todos los experimentos realizados, en ausencia de ADN exógeno, no se detectaron transformantes resistentes a kanamicina. Los resultados obtenidos indican que la cepa VC638 es más resistente a la transformación natural *in vitro* que su parental toxigénico y que esta discapacidad no está relacionada con la imposibilidad de ensamblar la pilina MSHA.

Resultó de interés también, estudiar cuál era el resultado de este ensayo cuando se adiciona al sistema ADN soluble proveniente de una cepa en la que el marcador de contraselección se localiza en el entorno genético de los genes de la toxina, el fago CTX ϕ . Los resultados obtenidos demuestran que, mediante transformación natural *in vitro*, el entorno genético de los genes *ctxAB* presente en hebras de ADN soluble se transfiere con menor frecuencia hacia VC638 que hacia la cepa salvaje *V. cholerae* C7258 (Prueba U de Mann Whitney, $p = 0,0284$) (Fig. 4B).

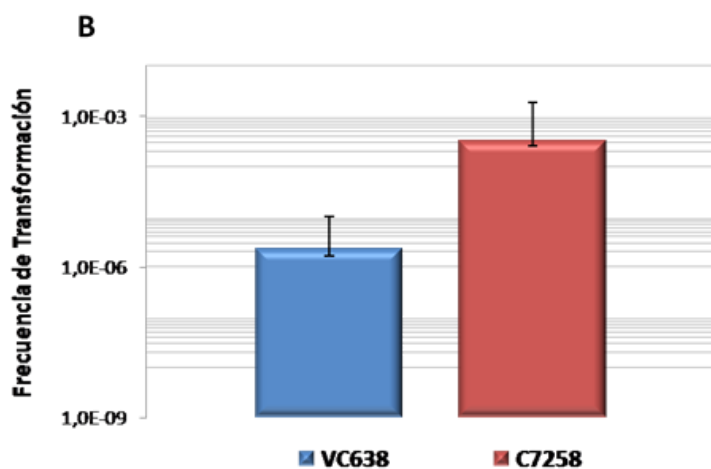


Fig. 4. Transformación natural de cepas de *V. cholerae* sobre una superficie de exoesqueleto de langosta. Se determinó la frecuencia de transformación inducida por quitina empleando **B)** ADN marcado en el locus de los genes *ctxAB*, como UFC Kan^R /UFC totales. Se representa la media geométrica de tres experimentos independientes. Las barras de error representan los valores extremos.

En *V. cholerae* operan una gran variedad de mecanismos de movilidad genética horizontal entre los que se destacan la isla patogénica VPI, ⁽⁵⁷⁾ que codifica para el pelo regulado con la toxina (TCP) y diferentes fagos filamentosos. ^(58, 59) Sin embargo, en el caso de CTX ϕ , las posibilidades de reversión a la virulencia por infección con este fago, que porta los genes que codifican la toxina del cólera, se limitan fundamentalmente al entorno intestinal, donde se expresa su receptor, el TCP. ^(59, 60) Existen otros vibriófagos, como VGJ ϕ , que podrían tener ventajas sobre CTX ϕ para transmitir los genes que codifican la toxina del cólera bajo condiciones como las encontradas en el ambiente. ^(58, 61, 62) Estos fagos emplean como receptor la fimbria MSHA, la cual se expresa en el entorno acuático, y pudieran participar en la trasmisión de genes tóxicos por un mecanismo consistente en la transducción especializada mediante fagos híbridos con CTX ϕ . En este sentido, la incapacidad de VC638 para producir MSHA reduce la posibilidad de readquisición de genes tóxicos por esta vía. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que *in vitro* la probabilidad de adquisición de genes foráneos por parte de VC638 mediante transformación natural es menor que la de su parental toxigénico.

Empleando experimentos similares, Katz y cols (2010) demostraron que la frecuencia de transformación con ADN soluble en el medio de cultivo era muy baja en las cepas que circulaban en Haití en el año 2010. ⁽⁶³⁾ Estas cepas resultaron transformarse de 10^3 a 10^4 veces menos que la cepa de referencia *V. cholerae* C6706 (cepa parental de KHT46 que tiene interrumpido el gen *lacZ* con un gen de resistencia a kanamicina ⁽⁶⁴⁾), resultado similar al reportado en este trabajo. Estas cepas están desfavorecidas para ser transformadas en ensayos *in vitro*. VC638, al igual que las cepas toxigénicas de circulación actual en el Caribe, tiene limitada *in vitro* su capacidad para adquirir ADN foráneo, por lo que pudiera esperarse que en el ambiente ocurriera de manera similar. Otros abordajes experimentales deberán realizarse para dilucidar estas interrogantes con mayor precisión.

La readquisición de genes de toxicidad e incluso el surgimiento de nuevas variantes toxigénicas de *V. cholerae* están determinados en la naturaleza por la combinación de factores genéticos y ecológicos. No obstante, aunque la disponibilidad y eficiencia de los mecanismos de intercambio genético descritos pueden ser el factor principal, otros factores deben influir en el surgimiento de cepas patógenas, dado que en la naturaleza la potencialidad epidémica se ha mantenido restringida a los serogrupos O1 y O139. ⁽⁶⁵⁾

CONCLUSIONES

La cepa atenuada *V. cholerae* 638, no tiene ventajas con respecto a su parental toxigénico para sobrevivir en condiciones *in vitro* que simulan ambientes naturales. Su capacidad de osmotolerancia es similar al de otras cepas de *V. cholerae*, mientras que es más susceptible al detergente SDS. Además, tiene afectada la capacidad de transformación natural *in vitro* con ADN soluble, por lo que no logra incorporar con eficiencia genes foráneos provenientes de otras cepas, tales como pudieran ser los de la toxina del cólera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grossart HP, Levold F, Allgaier M, Simon M, Brinkhoff T. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*. 2005;7(6):860-73.
2. Zelada A, Ledón TY, Fando RA. El cólera: una enfermedad infecciosa reemergente. El candidato vacunal CV638, una herramienta para su prevención. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2015;46(2):131-43.
3. Lipp EK, Huq A, Colwell RR. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(4):757-70.
4. Huq A, Sack RB, Nizam A, Longini IM, Nair GB, Ali A, *et al*. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(8):4645-54.
5. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1998;62(4):1301-14.
6. Colwell RR. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. 1994;117-33.
7. Scrudato ML, Blokesch M. A transcriptional regulator linking quorum sensing and chitin induction to render *Vibrio cholerae* naturally transformable. *Nucleic acids research*. 2013;gkt041.
8. Metzger LC, Blokesch M. Composition of the DNA-uptake complex of *Vibrio cholerae*. *Mobile genetic elements*. 2014;4(1):17987-92.
9. Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu C-Y, Schoolnik GK. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science*. 2005;310(5755):1824-7.
10. Thompson JR, Pacocha S, Pharino C, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Benoit J, *et al*. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*. 2005;307(5713):1311-3.
11. Salud OPdl. Actualización Epidemiológica del cólera 20 de marzo 2014. OPS Washington, DC; 2014.
12. (OMS) OMDIS. Actualización Epidemiológica del Cólera. 2015, diciembre 23.
13. Mas P. La epidemiología en Cuba a 100 años de la desaparición física de Carlos Juan Finlay. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 2005;5(2).
14. Ledón TY. Obtención y caracterización de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139 para identificar ingrediente farmacéutico activo de una vacuna contra el cólera. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencia Biológicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. 2013.
15. González LM, Casanova MdC, Pérez J. Cólera: historia y actualidad. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*. 2011;15(4):280-94.
16. Díaz M, Pérez A, Fernández R, Bravo L, García H, Valera R, *et al*. Ensayo clínico de reto, para evaluar una cepa candidata a vacuna contra el cólera. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2010;62(3):194-9.
17. Peidro H, Marrero K, Ledón T, Fando R. Desarrollo de un ensayo de PCR para detectar los genes codificadores de la toxina del cólera (*ctxAB*) en preparaciones del candidato vacunal vivo atenuado CV638. *Vacunas*. 2016;17(2):55-61.
18. García H, Valera R. Evaluación clínica de un candidato vacunal basado en la cepa atenuada 638 *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa. *VacciMonitor*. 2007;16(2):33-4.
19. García L, Jidy MD, García H, Rodríguez BL, Fernández R, Cedré B, *et al*. The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. *Infection and immunity*. 2005;73(5):3018-24.
20. Ryan ET, Calderwood SB, Qadri F. Live attenuated oral cholera vaccines. *Expert review of vaccines*. 2006;5(4):483-94.
21. Cornet P, Millet J, Béguin P, Aubert J-P. Characterization of two cel (cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases. *Nature Biotechnology*. 1983;1(7):589-94.
22. Imia LG, Hernández RO, Marrero BC, Pérez TV, Sánchez HG, Coronel AT, *et al*. Intraduodenal inoculation of adult rabbits for evaluating the immunogenicity of genetically attenuated *Vibrio cholerae* strains. *Comparative Medicine*. 1998;48(5):538-41.
23. Ledón T, Marrero K, Carrandi K, Payne G, Miguel Y, Serrano Y, *et al*. Excreción de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638 en las heces de sujetos cubanos de edad pediátrica durante un ensayo clínico controlado, aleatorizado ya doble ciego. *Revista CNIC Ciencias Biológicas*. 2015; 46 (Especial): 332-337.

24. Waldor MK, Tschäpe H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *Journal of bacteriology*. 1996;178(14):4157-65.
25. Silva Y, Rodríguez BL, Campos J, Martínez E, Marrero K, Suzarte E, *et al.* Análisis de la expresión de las pilinas TCP y MSHA de *Vibrio cholerae* en diferentes condiciones de crecimiento *in vitro*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2005;36(1).
26. Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Kawabata S-I, Yoshida S-I. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(10):3648-55.
27. Xu H, Roberts N, Singleton F, Attwell R, Grimes D, Colwell R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial ecology*. 1982;8(4):313-23.
28. Colwell RR. Viable but not cultivable bacteria. *Uncultivated microorganisms*: Springer; 2009. p. 121-9.
29. Fernández M, García MA, Contreras M, Incani RN, Chirinos H, Rojas H, *et al.* Survival, induction and resuscitation of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state in the Southern Caribbean Sea. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015;57(1):21-6.
30. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 2010;34(4):415-25.
31. de Magny GC, Hasan NA, Roche B. How community ecology can improve our understanding of cholera dynamics. *Vibrio ecology, pathogenesis and evolution*. 2014:235.
32. Senoh M, Ghosh-Banerjee J, Mizuno T, Shinoda S, Miyoshi Si, Hamabata T, *et al.* Isolation of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 from environmental water samples in Kolkata, India, in a culturable state. *MicrobiologyOpen*. 2014;3(2):239-46.
33. Sung H-H, Chen C-K, Shih P-A, Hsu P-C. Induction of viable but non-culturable state in *Vibrio cholerae* O139 by temperature and its pathogenicity. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2006;14(3).
34. Ramaiah N, Ravel J, Straube W, Hill R, Colwell R. Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but nonculturable state. *Journal of applied microbiology*. 2002;93(1):108-16.
35. Adams B, Bates T, Oliver J. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(12):7462-6.
36. Rahman I, Shahamat M, Kirchman P, Russek-Cohen E, Colwell R. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Applied and environmental microbiology*. 1994;60(10):3573-8.
37. Lindbäck T, Rottenberg ME, Roche SM, Rørvik LM. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Veterinary research*. 2010;41(1):1-10.
38. Borroto RJ. Supervivencia de *Vibrio cholerae* O1 en agua dulce superficial y cólera endémico: una hipótesis geocológica. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 1998;4(6).
39. Wu B, Liang W, Kan B. Growth Phase, Oxygen, Temperature, and Starvation Affect the Development of Viable but Non-culturable State of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in microbiology*. 2016;7.
40. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Bacterial pathogens in the non-clinical environment*. 2015:72.
41. Valeru SP, Wai SN, Saeed A, Sandström G, Abd H. ToxR of *Vibrio cholerae* affects biofilm, rugosity and survival with *Acanthamoeba castellanii*. *BMC research notes*. 2012;5(1):1.
42. Roldána ML, Oterob JL, Villarreal F, Baronia MR, Carrascoc MS, Álvarez C, *et al.* Efecto inhibitor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157: H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2011;31:37-41.
43. Yildiz FH, Liu XS, Heydorn A, Schoolnik GK. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Molecular microbiology*. 2004;53(2):497-515.
44. Ledón T, Hernández DD, Marrero K, Fando R. Modelación in vitro del comportamiento ambiental de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139. *Biotecnología Aplicada*. 2014;31(2):129-35.
45. Grau BL, Henk MC, Pettis GS. High-frequency phase variation of *Vibrio vulnificus* 1003: isolation and characterization of a rugose phenotypic variant. *Journal of bacteriology*. 2005;187(7):2519-25.
46. Fong JC, Karplus K, Schoolnik GK, Yildiz FH. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*. 2006;188(3):1049-59.
47. Seper A, Pressler K, Kariisa A, Haid AG, Roier S, Leitner DR, *et al.* Identification of genes induced in *Vibrio cholerae* in a dynamic biofilm system. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014;304(5):749-63.
48. Matz C, McDougald D, Moreno AM, Yung PY, Yildiz FH, Kjelleberg S. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(46):16819-24.
49. Jutla A, Whitcombe E, Hasan N, Haley B, Akanda A, Huq A, *et al.* Environmental factors influencing epidemic cholera. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013;89(3):597-607.
50. Louis VR, Russek-Cohen E, Choopun N, Rivera IN, Gangle B, Jiang SC, *et al.* Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(5):2773-85.
51. Chávez MdRC, Sedas VP, Borunda EO, Reynoso FL. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. *Marine Pollution Bulletin*. 2005;50(12):1641-8.
52. Thomas K, Joseph N, Raveendran O, Nair S. Salinity-induced survival strategy of *Vibrio cholerae* associated with copepods in Cochin backwaters. *Marine Pollution Bulletin*. 2006;52(11):1425-30.
53. Chakrabarti SR, Chaudhuri K, Sen K, Das J. Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU. *Journal of bacteriology*. 1996;178(2):524-30.

54. Provenzano D, Klose KE. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(18):10220-4.
55. Bina XR, Provenzano D, Nguyen N, Bina JE. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infection and immunity*. 2008;76(8):3595-605.
56. Molina LS. Influencia del contraión en las propiedades biológicas de tensioactivos aniónicos derivados de N-alfa, N-epsilon-diocetanoillisina: citotoxicidad y ecotoxicidad "in vitro". Tesis en Opción al Grado de Doctor. Universidad de Barcelona. 2006.
57. Karaolis DK, Johnson JA, Bailey CC, Boedeker EC, Kaper JB, Reeves PR. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(6):3134-9.
58. Campos J, Martínez E, Suzarte E, Rodríguez BL, Marrero K, Silva Y, et al. VGJΦ, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTXΦ. *Journal of bacteriology*. 2003;185(19):5685-96.
59. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996;272(5270):1910.
60. Angelichio MJ, Spector J, Waldor MK, Camilli A. *Vibrio cholerae* intestinal population dynamics in the suckling mouse model of infection. *Infection and immunity*. 1999;67(8):3733-9.
61. Campos J, Martínez E, Marrero K, Silva Y, Rodríguez BL, Suzarte E, et al. Novel type of specialized transduction for CTXΦ or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJΦ in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*. 2003;185(24):7231-40.
62. Das B, Bischerour J, Barre F-X. Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes. *The Indian journal of medical research*. 2011;133(2):195.
63. Katz LS, Petkau A, Beaulaurier J, Tyler S, Antonova ES, Turnsek MA, et al. Evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a single-source introduction to Haiti. *MBio*. 2013;4(4):e00398-13.
64. Antonova ES, Hammer BK. Quorum-sensing autoinducer molecules produced by members of a multispecies biofilm promote horizontal gene transfer to *Vibrio cholerae*. *FEMS microbiology letters*. 2011;322(1):68-76.
65. Udden SN, Zahid MSH, Biswas K, Ahmad QS, Cravioto A, Nair GB, et al. Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(33):11951-6.