

Vacunas Para Prevenir el Cólera

MYRON M. LEVINE Y WILBUR H. CHEN

Vacunas Para Prevenir el Cólera

Myron M. Levine, M.D., D.T.P.H.

Profesor Distinguido de la Cátedra Simon y Bessie Grollman; Decano Adjunto de Salud Mundial, Vacunología y Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina de la Universidad de Maryland, Baltimore, MD 21201, EE, UU

Wilbur H. Chen, M.D., M.S.

Jefe, Sección de Estudios Clínicos en Adultos, Centro para la Fomulación de Vacunas y Profesor Adjunto de Medicina, Facultad de Medicina de la Universidad de Maryland, Baltimore, MD 21201, EE, UU

Introducción

El cólera, la enfermedad diarreica aguda provocada por los serogrupos O1 y, ocasionalmente, O139 del *Vibrio cholerae*, tiene importancia fundamental para la salud pública debido a la gravedad de la enfermedad clínica que suscita ("cólera grave", causante de la muerte de no tratarse), su conducta epidémica fulminante y la propensión a ocurrir en pandemias extensas que afectan a muchos países en el curso de varios años. Las vacunas anticoléricas orales que han ingresado al mercado en los últimos años se emplean para mitigar la intensidad de la enfermedad estacionaria en zonas endémicas, proteger a poblaciones de alto riesgo (como refugiados internados en campamentos en zonas con cólera endémico o zonas adyacentes al cólera) y proteger a viajeros de países y regiones sin cólera que visitan países y regiones en los que el cólera es epidémico o endémico. El uso potencial restante de las vacunas anticoléricas, según se dice el más importante, está dirigido a controlar epidemias fulminantes extensas en poblaciones que no han estado expuestas inmunológicamente (la llamada epidemia en "suelo virgen") como cuando el cólera regresó a América del Sur en 1991 tras una ausencia de un siglo y el brote de 2010 en Haití tras un terremoto devastador^{1,2}. La epidemia en suelo virgen recarga gravemente los recursos de las autoridades públicas de salud nacionales y locales y perturba a la sociedad civil. El control de dichas epidemias exige una vacuna que confiera un alto nivel de protección a personas que no han estado expuestas inmunológicamente dentro de unos cuantos días solamente de la administración de una dosis única. Las características de una de las vacunas nuevas (dosis única, protección a los 8 a 10 días tras la vacunación) afianzan el control de la epidemia en suelo virgen³, en especial cuando dicha epidemia ocurre simultáneamente con emergencias complejas (terremotos, inundaciones, guerras).

Agentes etiológicos

Se han identificado alrededor de 206 serogrupos O del *Vibrio cholerae* pero sólo dos, O1 y O139, expresan sistemáticamente la enterotoxina del cólera, las pilosidades de fijación y provocan la epidemia del cólera⁴. En el serogrupo O1 son dos los serotipos principales, Inaba y Ogawa; un tercer serotipo, Hikojima, es inusual. Las cepas del serogrupo O1 se clasifican también en dos biotipos, clásico o El Tor. Prácticamente toda la enfermedad por cólera que se manifiesta en el mundo se debe a variantes del biotipo El Tor. Se han identificado variantes emergentes de El Tor que expresan la enterotoxina colérica del biotipo clásico y, ocasionalmente, las pilosidades correguladas de la toxina clásica (TCP), los orgánulos por los que el vibrión colérico se adhiere a los enterocitos como un paso clave en la patogenia del cólera⁵⁻⁸. Estas formas "híbridas de El Tor" que expresan una enterotoxina clásica pueden provocar una enfermedad clínica más grave que las cepas de El Tor auténticas⁹.

Epidemiología

El delta del río Ganges en el sur de Asia es el hogar ancestral del cólera, lugar donde persiste entre pandemias como el "cólera asiático". La séptima pandemia de cólera, provocada por el *Vibrio cholerae* O1 El Tor, se originó a principios de la década de los 60 en la isla de Sulawesi, Indonesia, y se esparció progresivamente en oleadas en las seis décadas siguientes hasta afectar en un momento u otro a prácticamente todos los países en desarrollo y en transición del mundo⁴. En muchos persiste su endemidad en subpoblaciones y en nichos⁴. De este modo, el cólera es endémico ahora en muchos países del sur y el sudeste asiático, África Sub-sahariana y unos cuantos países de las Américas. A principios de los 90 fue endémico durante varios años en Perú, Ecuador y en algunos otros países de América Latina^{10,11}.

Cuando el cólera invade un territorio nuevo con poblaciones que inmunológicamente no han estado expuestas nunca, la incidencia más alta de la enfermedad se observa entre los varones adultos jóvenes. Si la enfermedad se torna endémica, la incidencia aumenta en las mujeres y los niños y, finalmente, el pico de la incidencia se observa en niños de corta edad. El cólera exhibe un patrón estacional prácticamente en todos los lugares en los que es endémico¹². Al comienzo de la nueva estación, los casos de cólera surgen en simultáneo en focos múltiples separados geográficamente. Este patrón se ha observado también cuando el cólera invade un territorio nuevo. En 1991, cuando el cólera invadió una vez más América del Sur con una epidemia fulminante y extensa en el Perú, surgieron brotes grandes prácticamente de manera simultánea en tres ciudades diferentes que abarcaban una franja de 900 kilómetros a lo largo de la costa del Pacífico¹². El aumento explosivo de casos observado al comienzo de muchas epidemias puede ser la consecuencia de vibriones hiperinfectivos liberados en fuentes de agua que carecen de vibriófagos. Por el contrario, la reducción de la epidemia puede ser consecuencia de una mayor prevalencia de bacteriófagos líticos en el agua^{13,14}.

Reservorios de la infección. Los seres humanos son los únicos hospederos naturales conocidos de la enfermedad del cólera producida por el *Vibrio cholerae* O1 y los portadores crónicos son infrecuentes^{15,16}. De este modo, se asumió anteriormente que en las zonas endémicas las infecciones moderadas y asintomáticas actuaban como reservorio para conservar la enfermedad hasta la próxima estación del cólera, cuando las condiciones favorecerían una vez más el afianzamiento de la transmisión. Sin embargo, las observaciones epidemiológicas en la década de los 70 refutaron este supuesto y abrieron paso a un nuevo entendido de la epidemiología del cólera que aclaró gran parte de la conducta epidemiológica que había sido anteriormente desconcertante. En 1973, la confirmación de un solo caso de cólera en Texas en un pescador provocado por una cepa de El Tor Inaba altamente hemolítica de manera inusual¹⁷, seguido 5 años después por un brote de cerca de dos decenas de casos de la misma cepa atribuido a mariscos consumidos sin un proceso de cocción adecuado como el vector¹⁸, llevó a la identificación de un foco ambiental de la infección en la costa del Golfo de México de los Estados Unidos¹⁹. Se estableció que esta cepa de El Tor Inaba era parte de la flora autóctona de las aguas salobres de los estuarios del Golfo, lugar en el que se la asoció con crustáceos (camarones, etc.) consumidos como los mariscos del lugar. La identificación de un foco ambiental similar del *Vibrio cholerae* O1 El Tor enterotoxinógeno en Queensland, Australia, respalda la hipótesis de que los nichos ambientales de aguas salobres pueden servir como reservorio del *Vibrio cholerae* O1²⁰.

El vibrión colérico puede ingresar a un estado "viable pero no cultivable" que le permite sobrevivir condiciones ambientales rigurosas mediante una forma de hibernación bacteriana^{16,21}. Cuando el vibrión colérico toxinógeno finalmente encuentra condiciones favorables de temperatura, salinidad y pH, se rejuvenece y recupera el potencial para metabolizarse y crecer activamente²¹. Asimismo, en estas condiciones se posibilita el desarrollo del zooplancton.

Modalidades de transmisión. Nuestro conocimiento práctico de los vectores de transmisión del cólera es producto de investigaciones de casos y testigos en las que se ha documentado la transmisión hídrica y una gama de vectores alimenticios^{22,23}. En 1991, cuando el cólera El Tor azotó la costa del Pacífico de varios países andinos de América del Sur, el funcionamiento inadecuado de los sistemas de la red interna de abastecimiento de agua y de alcantarillado, la contaminación de aguas de superficie y la insalubridad en los métodos de almacenamiento de agua en el hogar propiciaron la transmisión hídrica simplista del cólera^{1,24}. Se culpó a las bebidas preparadas con agua contaminada y comercializadas por vendedores en la calle, el hielo e incluso el agua embotellada comercialmente²⁵.

El *Vibrio cholerae* O1 puede ser transmitido en vectores de mariscos por medio de la adherencia natural al exoesqueleto quitinoso de camarones, cangrejos y ostras en ciertos medios de estuarios^{18,21,26}, o los alimentos se pueden contaminar más adelante durante la preparación o manipulación²⁷. Los vectores alimenticios más frecuentes han sido los mariscos crudos o cocinados insuficientemente, como mejillones, camarones, ostras, almejas, berberechos, pescados, pescados salados secos y ceviche (pescado crudo o mariscos marinados en jugo de limón o lima).

Los granos, el arroz y los frijoles crudos con salsas han sido incriminados en la transmisión del cólera, en especial en África. Un pequeño inóculo de *Vibrio cholerae* O1 enterotoxinógeno introducido por un manipulador de alimentos en uno de estos tipos de alimentos y almacenado sin refrigeración puede aumentar varias veces en escala logarítmica dentro de las 8 a 12 horas. El cólera ha sido transmitido también por medio de verduras y frutas irrigadas con aguas residuales sin tratar o "lavadas" empapándolas con agua contaminada con aguas residuales²⁸.

Durante los brotes o las epidemias estacionales, el cólera se puede diseminar por varias modalidades de transmisión. Según las costumbres locales, el clima y otros factores, predominan modalidades y vectores específicos de transmisión²⁹. Finalmente, de persistir los vibriones coléricos patogénicos O1 y O139 en reservorios ambientales, se posibilita la transmisión por grandes distancias por medio del agua de lastre de las grandes embarcaciones que captan agua de lastre en un puerto y la descargan antes de ingresar a otro puerto a miles de kilómetros de distancia³⁰.

Los epidemiólogos reconocen que la diseminación del cólera por medio del contacto interpersonal no ocurre prácticamente nunca. La transmisión esencialmente ocurre por vía de los alimentos o los vectores hídricos.

Se ha sostenido a manera de hipótesis que el vibrión colérico toxicogénico permanece en estado hipertransmisible durante unas cuantas horas después de haber sido liberado en cantidades enormes por pacientes coléricos que eliminan heces acuosas^{13,14,31}. De este modo, si se manifiesta un caso grave de cólera en un entorno atiborrado de gente donde están presentes otros hospederos humanos susceptibles y modalidades de transmisión fáciles, la dosis infecciosa puede ser inusualmente baja y la diseminación de la enfermedad, fulminante¹³.

Factores de riesgo del hospedero. Ciertos factores del hospedero aumentan marcadamente el riesgo de padecer de cólera grave, incluso el grupo sanguíneo O^{32,33}, la hipoclorhidria^{34,35}, y la ausencia de inmunidad espontánea³⁶. Las personas del grupo sanguíneo O, a diferencia de las que tienen otro grupo sanguíneo, tienen un mayor riesgo de padecer cólera grave. Toda vez que el cólera invade un nuevo territorio con una población inmunológicamente no expuesta con anterioridad, las personas con hipoclorhidria a raíz de una gastrectomía parcial, gastritis crónica por *Helicobacter pylori*, etc., con frecuencia han constituido el caso inicial³⁷. La incidencia más alta de cólera en zonas endémicas suele verse en niños de entre 1 y 4 años de edad. En adelante

disminuye la incidencia específica para la edad y se incrementa la prevalencia y el valor de la media geométrica del anticuerpo sérico vibriocida, con el aumento de la inmunidad³⁸. Una excepción interesante a este patrón la constituyen las mujeres en edad de procrear que presentan una incidencia desmesuradamente alta¹².

Vigilancia internacional y notificación de enfermedades. Dado que el cólera fue la enfermedad en torno a la cual se organizó por primera vez la vigilancia y la notificación de salud pública moderna, lleva el código 001 en la Clasificación Internacional de Enfermedades. Por convenio internacional, el cólera es una enfermedad notificable junto con la peste y la fiebre amarilla. En 2014, 42 países notificaron 190.549 casos de cólera a la Organización Mundial de la Salud (OMS): el 55% se manifestó en países de África y el 15%, en países de las Américas. El número real de casos de cólera a nivel mundial es mucho más alto y la carga anual se calcula que ronda entre 1,4 y 4 millones de casos y entre 21.000 y 143.000 defunciones. Por motivos comerciales, el temor a los embargos de alimentos y los efectos en el turismo, muchos países demoran la notificación de casos de cólera a la OMS o no los notifican en absoluto. Por ejemplo, las estadísticas de salud internacionales a finales de las décadas de los 80 y los 90 indicaron que Bangladesh tenía un número bajo o nulo de casos de cólera. Sin embargo, se realizaron simultáneamente ensayos en el terreno a gran escala para evaluar las vacunas anticólicas durante los cuales se documentaron millares de casos confirmados³⁹.

La enfermedad

La infección por el cólera exhibe una gama de manifestaciones clínicas que van desde la excreción asintomática de vibriones en las heces hasta diarrea acuosa potencialmente mortal acompañada por deshidratación grave sintomática (cólera grave). Hasta tres cuartos de las infecciones por cólera pueden ser asintomáticas y entre los pacientes sintomáticos sólo una minoría sufre una evacuación grave de heces. La propensión a padecer cólera grave se vincula estrechamente con dos factores de riesgo en el hospedero: grupo sanguíneo O e hipoclorhidria. Si las pérdidas enormes de agua corporal y electrolitos no se reemplazan de inmediato en los pacientes coléricos que tienen evacuaciones de heces acuosas activamente (por ejemplo, a una tasa de un litro por hora en un adulto), el paciente se puede deshidratar rápidamente, sufrir anuria, choque y acidosis, y morir en el lapso de horas del inicio de la enfermedad. Los pacientes con cólera grave manifiestan signos y síntomas clásicos de deshidratación intensa: pulsos periféricos débiles o nulos, hipotensión, hundimientos de los ojos, pérdida de la turgencia cutánea y disminución de la diuresis. En la tabla 1 se comparan las concentraciones de electrolitos séricos en el suero normal de adultos y en las heces acuosas de adultos con cólera grave. La evacuación de grandes volúmenes de heces del tipo acuoso como indicación de cólera grave es el equivalente fisiológico a la pérdida de plasma que se deriva en la hemoconcentración, hipovolemia, hipotensión, disminución del flujo sanguíneo renal y choque hipovolémico sintomático.

Tabla 1 . Concentraciones de electrolitos en el suero normal de adultos y en heces acuosas de adultos con cólera grave

	Suero normal de adultos	Heces acuosas en pacientes con cólera grave
NA+	135-145 mEq/ml	135 mEq/ml
K+	135-145 mEq/ml	15 mEq/ml
Cl-	95-105 mEq/ml	100 mEq/ml
HCO ₃	24-30 mEq/ml	40 mEq/ml

Patogenia e inmunidad

El *Vibrio cholerae* O1 comprende un sistema de administración sofisticado en pasos múltiples de la toxina colérica, el atributo de virulencia responsable de la eliminación intensa de heces acuosas voluminosas características del cólera grave. En voluntarios la ingestión de tan solo 5 mcg de enterotoxina colérica purificada puede inducir a la enfermedad diarrea y 5 mcg suscitó un síndrome clínico que se asemeja profundamente a la evacuación intensa del cólera grave⁴⁰. En estudios posteriores en voluntarios con cepas vacunales del *Vibrio cholerae* O1 que albergaban supresiones en genes codificadores de la subunidad activa enzimáticamente (A), subunidades tanto A como B (de fijación) de la toxina colérica o todo el casete de virulencia de la toxina colérica (que codifica otras dos toxinas y un factor de colonización menor) se mostró que algunas cepas conservaron la capacidad de provocar diarrea moderada y otros síntomas gastrointestinales⁴¹, posiblemente por invocación de inflamación intestinal^{42,43}. Siempre que la ingestión de la toxina colérica purificada exclusivamente puede inducir un síndrome de purga grave, los vibriones totalmente patogénicos generadores del cólera natural codifican múltiples factores de virulencia que rigen una progresión gradual a la diarrea grave.

Tras la ingestión, el *Vibrio cholerae* O1 u O139 patogénico debe sobrevivir la barrera extraordinaria de ácido gástrico y transitar el píloro hasta llegar al intestino delgado proximal, el punto crítico de interacción entre el hospedero y el parásito. La ingestión sin disolución amortiguadora de 10^6 vibriones coléricos patogénicos viables a voluntarios norteamericanos en ayunas no produjo infección ni diarrea porque los vibriones fueron destruidos por el ácido gástrico⁴⁴. Por el contrario, cuando se administran 10^6 vibriones con disolución amortiguadora de bicarbonato de sodio o alimentos que protegen a los vibriones durante el tránsito gástrico, se presenta el cólera en cerca del 90% de los voluntarios⁴⁴. En realidad, cuando se administra con una disolución amortiguadora, tan solo 10^3 vibriones coléricos O1 El Tor provocan diarrea en ~67% de los voluntarios⁴⁴, si bien el volumen de heces es inferior que en los sujetos que ingieren dosis más altas de vibriones.

Una vez que los vibriones se encuentran en el intestino delgado, detectan su entorno por medio de ToxR, proteína que es producto de un gen regulador maestro, *toxR*⁴⁵. La activación de *toxR* conduce a la expresión de la toxina colérica y las pilosidades correguladas (TCP) de la toxina, el factor de colonización intestinal clave^{46,47}, y a la activación indirecta (por medio de *toxT*) de aproximadamente otros 17 genes de la adaptación bacteriana a la supervivencia en el intestino humano. En el proceso de degradación de la barrera de mucosidad en la superficie del intestino por parte de la neuraminidasa y otras enzimas de vibriones, la motilidad desempeña una función crítica dado que el flagelo unipolar impulsa a los organismos hacia la superficie enterocítica, atraídos por quemoatctinas.

Las TCP constituyen el mayor factor de colonización intestinal para los vibriones coléricos O1 y O139^{46,47}. Las TCP de El Tor y O139 son idénticas genéticamente y antigenéticamente pero difieren en cierto modo de las TCP del biotipo clásico. Los genes para la biogénesis de las TCP se encuentran dentro de una isla de patogenia de los vibriones de 40 Kb (VPI). Una cepa mutante del *Vibrio cholerae* O1, incapaz de expresar TCP, no logró colonizar el intestino ni estimular buenas respuestas de anticuerpos vibriocidas en voluntarios⁴⁸.

En estudios de provocación experimentales en voluntarios se indicó que un episodio único de cólera clínica debido a cualquiera de los dos serotipos (Inaba u Ogawa) dentro de un biotipo estimuló protección del orden del 90 al 100% contra la enfermedad clínica tras la provocación experimental posterior con el serotipo homólogo o heterólogo del *Vibrio cholerae* O1 y la protección suscitada por la infección por biotipos clásicos perduró durante al menos tres años^{44,49,50}. Estas observaciones de inmunidad potente derivada de la infección se corroboraron en el terreno con la enfermedad natural del cólera^{12,51}, lo cual refuta las sugerencias anteriores de que un episodio inicial de cólera suscitó protección escasa o sólo de corta duración⁵².

Respuesta inmune

Tras la infección por el *Vibrio cholerae* O1, se observan respuestas robustas de los anticuerpos vibriocidas séricos y aumentos de la antitoxina colérica de la inmunoglobulina G (IgG)^{53,54}. Aproximadamente el 90% de los anticuerpos vibriocidas dependientes de complementos se dirigen al antígeno O y el 10% restante de los anticuerpos se dirigen a los antígenos proteicos. Tras una infección por cólera, individuos sensibilizados inmunológicamente registran respuestas fuertes de los anticuerpos intestinales secretores de IgA (SIgA). Sin embargo, aumentos marcados de SIgA contra LPS y las antitoxinas son sorprendentemente inusuales en individuos no sensibilizados. La detección de células intestinales secretoras transportadoras de anticuerpos que contienen IgA y productoras de anticuerpo específico para los antígenos de LPS y CT es una buena medida de la sensibilización del sistema inmunitario intestinal⁵⁵.

Si bien se considera que la inmunidad al cólera derivada de la infección está mediada por anticuerpos SIgA de la mucosa intestinal, los anticuerpos vibriocidas séricos son los mejores marcadores de la protección^{36,56,57}. Estos anticuerpos séricos pueden representar indirectamente la estimulación de los anticuerpos intestinales. Las respuestas contra las subunidades B séricas son más prominentes en los pacientes coléricos pediátricos, mientras que las respuestas de los anticuerpos séricos a LPS y TCP son más prominentes en los adultos⁵⁸. Si bien surgen concentraciones altas de anticuerpos vibriocidas específicos después de la infección por el *Vibrio cholerae* O1, las respuestas vibriocidas tras la infección por O139 son débiles y más bien carentes de especificidad⁵⁹. Aún no se ha identificado un marcador de protección para el cólera tipo O139.

Diagnóstico

El diagnóstico de cólera se confirma mediante el aislamiento del *Vibrio cholerae* en cultivos de heces por medios de cultivo selectos como agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) tanto directamente como después del enriquecimiento en solución de peptona alcalina⁶⁰; se aglutinan las colonias sospechosas con sueros de tipificación (directamente o después de un subcultivo). Las pruebas rápidas sin cultivo que detectan los antígenos de lipopolisacáridos del *Vibrio cholerae* O1 y O139 son útiles en situaciones de campo⁶¹⁻⁶³.

Tratamiento

Los antimicrobianos adecuados son un complemento importante para el tratamiento rehidratante dado que disminuyen el volumen y la duración de la evacuación y restringen rápidamente la excreción de vibriones, con lo cual se reduce la posibilidad de transmisión secundaria. Los pacientes que sobreviven el choque hipovolémico y la deshidratación grave manifiestan ciertas complicaciones, como la hipoglicemia, las cuales se deben reconocer y tratar de inmediato. Si estas pautas fundamentales se siguen correctamente, la letalidad, incluso durante epidemias fulminantes en países en desarrollo, se puede mantener por debajo del 1%^{64,65}. La inobservancia de estas reglas clínicas básicas comprobadas puede redundar en una letalidad inaceptablemente alta^{66,67}.

Tratamiento rehidratante. Los pacientes que padecen deshidratación grave a raíz del cólera con choque sintomático o sin éste, por lo general, pierden ~10% de su peso corporal y necesitan la rehidratación de inmediato por vía intravenosa. El tratamiento rehidratante se divide en dos fases: (1) la fase de rehidratación (el reemplazo rápido de la insuficiencia de agua y electrolitos), y (2) la fase de mantenimiento (la infusión de líquidos para reemplazar las pérdidas en curso). Las insuficiencias de líquidos y electrolitos se deben suplir tan rápidamente como sea posible (dentro de

las 2 a 4 horas del inicio). El plazo recomendado para la rehidratación en los pacientes adultos y pediátricos es de 3 y 6 horas, respectivamente. En los adultos, el 30% de los líquidos totales necesarios se administran en los primeros 30 minutos, mientras que en los niños este volumen se administra en el lapso de una hora. Usualmente, los pacientes con cólera grave requieren de varios litros de líquidos por vía intravenosa para lograr la estabilización hasta el punto en el que se puede comenzar con la rehidratación oral. Se interrumpe cuidadosamente la rehidratación por vía intravenosa a la mayor brevedad posible. En términos generales, los adultos que padecen de cólera grave necesitan entre 8 y 12 litros de líquidos por vía intravenosa para que la hidratación oral exclusivamente pueda recuperar las pérdidas. El líquido de rehidratación por vía intravenosa que se utiliza de manera más generalizada en todo el mundo para tratamiento del cólera es la solución de Ringer lactato habida cuenta de su disponibilidad generalizada. La solución de Ringer lactato contiene Na^+ 130 mEq/L, K^+ 4 mEq/L, Ca^{++} 3 mEq/L, Cl^- 111 mEq/L y lactato (precursor de HCO_3^-) 29 mEq/L. Habida cuenta de que la concentración de K^+ en la solución de Ringer lactato es demasiado baja, se debe administrar un complemento de K^+ ya sea mediante el agregado de una solución de KCl estéril (o sal de potasio similar) a la solución de Ringer lactato para aumentar la concentración de K^+ a 15–20 mEq/L, o con el inicio de la rehidratación oral.

En el paciente colérico se debe medir el volumen de todas las pérdidas diarreicas y por vómito. Una vez que se rehidrató al paciente hasta llegar a la fase del tratamiento de mantenimiento, la rehidratación suele basarse en periodos de 6 horas. La pérdida total de líquidos durante el periodo anterior de 6 horas constituye el volumen de líquidos que se administrará al paciente durante las próximas 4 a 6 horas. A medida que comienzan a disminuir las pérdidas diarreicas, los requisitos de rehidratación cada 6 horas disminuyen del mismo modo.

El tratamiento rehidratante intenso con líquidos y electrolitos produce una rápida mejora clínica en el paciente (por ejemplo, la elevación de la presión arterial, pulso más fuerte, mejoría de la turgencia cutánea y mayor grado de conciencia) que se reflejan en ensayos de laboratorio simples (por ejemplo, la caída en la gravedad específica de hematocritos y plasma). Una vez que se reestablece la perfusión renal, los mecanismos homeostáticos normales comienzan a combatir la acidosis y regular las concentraciones de electrolitos en el suero.

Los pacientes con deshidratación leve o moderada y tasas de purgación moderadas (< 500 ml por hora), por lo general, pueden ser tratados con la rehidratación oral solamente. El tratamiento de rehidratación oral se basa en el hecho fisiológico que el cotransporte mediado por glucosa de sodio y agua por la superficie mucosal del epitelio del intestino delgado permanece intacto durante la infección por el cólera a pesar del efecto de la toxina colérica⁶⁸. De ser copiosa la diarrea, se deben ingerir grandes volúmenes de líquidos de rehidratación oral a fin de contrarrestar las pérdidas en curso.

La solución de rehidratación oral (SRO) recomendada por la OMS para tratamiento del cólera está compuesta por Na^+ 90 mEq/L, Cl^- 80 mEq/L, K^+ 20 mEq/L, citrato 30 mEq/L y glucosa 111 mmol/L. Sobres con contenido suficiente de sales y glucosa para preparar 1 litro de solución de rehidratación están ampliamente disponibles en los países en desarrollo. Cada sobre contiene 3,5 gr de NaCl, 2,9 gr de citrato sódico, 1,5 gr de KCl y 20 gr de glucosa. En algunos países de Asia, para el tratamiento del cólera se emplean soluciones de rehidratación oral sobre la base de cereales que brindan varios sustratos transportados activamente⁶⁹; algunos ensayos comparativos no demostraron ventaja en relación con el uso de SRO con glucosa⁷⁰. Las soluciones de rehidratación con osmolaridad reducida (Na^+ 75 mEq/L, Cl^- 65 mEq/L, K^+ 20 mEq/L, citrato⁻ 30 mEq/L y glucosa 75 mmol/L) son polémicas en el tratamiento del cólera⁷¹. Si bien la tasa y el volumen de la evacuación se reducen a diferencia de las SRO estándar, algunos pacientes presentan hiponatremia (si bien, por lo general, es asintomática).

El régimen para calcular la cantidad de solución de rehidratación oral que se administrará para suplir las pérdidas en curso difiere con la edad. Dado que la concentración de Na^+ en las heces coléricas es de aproximadamente 135 mEq/L en los adultos, volúmenes de uno y medio de la solución de rehidratación oral

que contiene 90 mEq/L deben administrarse por cada volumen de heces diarreicas acuosas eliminadas a fin de reemplazar adecuadamente las pérdidas de Na⁺. Por el contrario, en niños de corta edad en quienes la concentración de Na⁺ en las heces coléricas sólo es de aproximadamente 100 mEq/L, las pérdidas actuales se pueden reemplazar sobre la base de una relación de 1:1 de solución de rehidratación oral a volumen de heces diarreicas. El volumen de consumo de la solución de rehidratación oral por hora tiene un límite práctico; en adultos y adolescentes el límite superior es de aproximadamente 750 mL/hora.

Tratamiento antibiótico. Los antibióticos adecuados disminuyen marcadamente la duración de la diarrea, el volumen total de heces diarreicas y la duración de la excreción del *Vibrio cholerae*, por lo que constituyen un complemento importante para el tratamiento rehidratante. Crece la resistencia del *Vibrio cholerae* O1 a los antibióticos normalmente utilizados. Antiguamente se utilizaron la tetraciclina y su derivado de acción prolongada, la doxiciclina, de manera extensa en el tratamiento del cólera pero la resistencia a estos fármacos en zonas endémicas de Asia y África ha disminuido su utilidad. Sin embargo, continúan siendo útiles toda vez que el control de las cepas de los vibriones documenta su sensibilidad. El régimen para los adolescentes y los adultos es de 500 mg cuatro veces al día durante 3 a 5 días y la dosis pediátrica para la tetraciclina es de 50 mg/kg/día en cuatro dosis divididas en 3 a 5 días. La doxiciclina exige solamente una administración diaria (300 mg para adultos y adolescentes y entre 4 y 6 mg/kg para niños, durante 3 a 5 días). El curso muy breve del tratamiento con la tetraciclina para el cólera evita la tinción de los dientes y otras reacciones adversas que se observan, de otro modo, con cursos prolongados de este antibiótico.

En zonas en las que prevalecen los vibriones coléricos resistentes a la tetraciclina, la ciprofloxacina en dosis de 250 mg una vez al día durante tres días constituye el régimen elegido⁷²; los resultados de algunos ensayos, no todos, con una dosis única de ciprofloxacina también fueron buenos⁷³⁻⁷⁵. La dosis única de azitromicina (1 gr en adultos) ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del cólera tanto en adultos como en niños. En un ensayo clínico aleatorizado, una dosis única de azitromicina (20 mg/kg, dosis máxima de 1 g) fue tan eficaz como tres días de tratamiento con eritromicina (12,5 mg/kg cada 6 horas)⁷⁶. El uso de trimetropina sulfametoxazol se debe evitar en zonas en las que se sabe que prevalece el O139 debido a que el *Vibrio cholerae* O139 suele ser resistente a este antibiótico⁷⁷. Durante las epidemias en países en desarrollo, el tratamiento con antibióticos durante un solo día o una dosis única (como 1 gr de ciprofloxacina o 300 mg de doxiciclina para adultos o 1 gr de azitromicina) puede ser necesarios en entornos de recursos limitados^{75,78}, en particular si los antibióticos no están ampliamente disponibles. Sin embargo, la preocupación con el tratamiento de dosis única es que puede acelerar el surgimiento de resistencia.

Vacunas contra el cólera

Actualmente cuatro vacunas contra el cólera, todas de administración oral, han sido autorizadas:

1. Dukoral® (Crucell) comprende una combinación de bacterias del *Vibrio cholerae* O1 de células enteras atenuadas de ambos biotipos y serotipos más 1 mg de la subunidad B de la toxina colérica^{79,80}.
2. Shanchol™ (Shanta, Hyderabad, India) contiene una combinación de vibriones atenuados de los vibriones coléricos O1 (ambos biotipos y serotipos) y O139^{81,82}.
3. Euvichol® Plus (Eubiologics, Seúl, Corea) contiene la formulación de vibriones idéntica a la de Shanchol y Euvichol pero en una presentación simple y altamente práctica⁸³.
4. Vacuna anticolérica oral elaborada con microbios vivos Vaxchora® (PaxVax Bermuda, Ltd., Hamilton, Bermuda [parte de PaxVax, Redwood City, CA]) de una sola dosis comprende el *Vibrio cholerae* O1, cepa CVD 103-HgR, producto de la ingeniería genética^{3,84,85}.

En la tabla 2 se resume una comparación en detalle de las características sobresalientes de estas vacunas.

Tabla 2. Características destacadas de cuatro vacunas orales autorizadas contra el cólera

Parámetro de comparación	Dukoral	Shanchol	Euvichol	Vaxchora (CVD 103-HgR)	PxVx0200 (CVD 103-HgR) high dose (~ 10 ⁹ cfu)
Componentes	Inaba clásica termoactivada contra el <i>Vibrio cholerae</i> O1 (2.5x10 ¹⁰), Ogawa clásica (2.5x10 ¹⁰), Ogawa clásica inactivada con formol (2.5x10 ¹⁰), El Tor Inaba inactivada con formol (2.5x10 ¹⁰) y 1 mg de subunidad B de toxina colérica recombinante suspendida en 3 ml de disolución amortiguadora.	Inaba clásica termoactivada contra el <i>Vibrio cholerae</i> O1 (2.5x10 ¹⁰), Ogawa clásica (2.5x10 ¹⁰), Ogawa clásica inactivada con formol (2.5x10 ¹⁰), El Tor Inaba inactivada con formol (2.5x10 ¹⁰) y 1 mg de subunidad B de toxina colérica recombinante suspendida en 1,5 ml de disolución amortiguadora.	lbaña clásica termoactivada contra el <i>Vibrio cholerae</i> O1 (300 unidades de Elisa [UE]), Ogawa clásica (300 UE), Ogawa clásica inactivada con formol (300 UE), El Tor Inaba inactivada con formol (300 UE) y O139 inactivada con formol (300 UE) suspendida en 1,5 ml de disolución amortiguadora.	Cepa CVD 103-HgR de Inaba clásica recombinante contra el <i>Vibrio cholerae</i> O1 con supresión de <i>ctxA</i> e inserción de indicador de resistencia a Hg++ en <i>hlyA</i> (hemolisina A inactivada) (~10 ⁸ unidades formadoras de colonias [ufc])	Cepa CVD 103-HgR Inaba clásica recombinante contra el <i>Vibrio cholerae</i> O1 con supresión de <i>ctxA</i> e inserción de indicador de resistencia a Hg++ en <i>hlyA</i> (hemolisina A inactivada) (~10 ⁸ unidades formadoras de colonias [ufc])
N.º de dosis	2	2	2	1	1
Intervalo entre dosis	2 semanas	2 semanas	2 semanas	—	—
Buena tolerancia	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Eficacia o efectividad en poblaciones endémicas	~ 50%	~ 65%	~ 65% (por extrapolación de Shanchol)	La formulación con una dosis alta (10 ⁹ ufc) se usará en poblaciones endémicas.	Sí (eficacia del 79% por extrapolación de datos de Orochol E) ⁹⁷
Eficacia en adultos residentes en países industrializados	Sí	No	No	Sí ^{3,85}	Sí. (por extrapolación de Vaxchora) ^{3,85}
Duración de la eficacia	3–4 años ¹⁰⁶	5 años ⁹²	Extrapolación de datos de Shanchol	Al menos 6 meses (por extrapolación de Mutacol) ⁹⁶	Al menos 6 meses (por extrapolación de Mutacol)
Inicio de la eficacia tras la primera dosis	Desconocido Probablemente ≥ 21 días	Desconocido Probablemente ≥ 21 días	Desconocido Probablemente ≥ 21 días	8–10 días ^{3,96}	8–10 días ^{3,96}
Inmunidad colectiva	Sí	Sí	Probable	Probable	Probable
Respuestas inmunitarias reforzables	Sí	Sí	Extrapolación de datos de Shanchol	Sí, pero sólo al cabo de al menos 4 meses tras la vacunación primaria.	Sí, pero sólo al cabo de al menos 4 meses tras la vacunación primaria.

Parámetro de comparación	Dukoral	Shanchol	Euvichol	Vaxchora (CVD 103-HgR)	PxVx0200 (CVD 103-HgR) high dose (~ 10 ⁹ cfu)
Inmunogenia en lactantes mayores y en niños en edad preescolar.	Sí	Sí	Extrapolación de datos de Shanchol	Sí (extrapolación de datos de Orochol E) ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹	Sí (extrapolación de datos de Orochol E) ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹
Eficacia en lactantes mayores y en niños en edad preescolar.	Sí	Sí (menor que en niños mayores y en adultos)	Extrapolación de Shanchol	¿?	Edad ≥2 años (extrapolación de datos de Orochol E) ⁹⁷
Inocuidad e inmunogenia en embarazadas	Sí ¹¹⁰	Sí ¹¹¹	Extrapolación de Shanchol	¿?	¿?
Inocuidad e inmunogenia en personas infectadas por el VIH	Sí	Sí ¹¹²	Extrapolación de Shanchol	Sí (extrapolación de datos de Orochol E)	Sí
Presentación	Suspensión líquida de la vacuna en una ampolla de vidrio que contiene una dosis única y acompañada por una bolsita metálica de aluminio con disolución amortiguadora. La bolsita de la disolución amortiguadora se vacía en una taza con 150 de agua fría, se revuelve, se agregan los 3 ml de suspensión y se sigue mezclando. Para niños (de 2 años de edad y más, la mitad de los 150 ml de disolución amortiguadora se debe descartar (resta 75 ml) antes de agregar los 3 ml de la vacuna.	La suspensión líquida de la vacuna en las ampollas de vidrio contiene una dosis única. La tapa de la ampolla se quita con fórceps y el contenido de 1,5 de la ampolla se transfiere a la boca del vacunado.	La suspensión líquida de la vacuna en las ampollas de vidrio contiene una dosis única. La tapa de la ampolla se quita con fórceps y el contenido de 1,5 de la ampolla se transfiere a la boca del vacunado.	Bolsitas dobles, una bolsita contiene la vacuna liofilizada y la otra bolsita contiene polvo de la disolución amortiguadora. El contenido de la disolución amortiguadora se coloca en una taza, se agregan 100 ml de agua y se mezcla la solución. El contenido de la bolsita de la vacuna se agrega luego para reconstituir la vacuna liofilizada. Luego se ingiere la mezcla resultante de 100 ml de vacuna.	Bolsitas dobles, una bolsita contiene la vacuna liofilizada y la otra bolsita contiene polvo de la disolución amortiguadora. El contenido de la disolución amortiguadora se coloca en una taza, se agregan 100 ml de agua y se mezcla la solución. El contenido de la bolsita de la vacuna se agrega luego para reconstituir la vacuna liofilizada. Luego se ingiere la mezcla resultante de 100 ml de vacuna.
Estrategia para administrar la vacuna	Principalmente en campañas	Principalmente en campañas	Principalmente en campañas	Clínicas ambulantes	Principalmente en campañas

Vacunas orales inactivadas. Dukoral es el producto comercial de un prototipo para una vacuna anticolérica oral inactivada que se puso a prueba en voluntarios de los EE. UU. y luego en un ensayo de campo aleatorizado que se llevó a cabo en Bangladesh, en la década de los 80^{39,86}. El prototipo de la vacuna contenía una subunidad B purificada preparada con holotoxina por medio de separación bioquímica de la subunidad B de la subunidad A tóxica. La formulación comercial actual, Dukoral, contiene la subunidad B recombinante⁸⁷. En evaluaciones posteriores a la concesión de la licencia quedó demostrado que Dukoral es bien tolerada y confiere protección contra el cólera^{88,89}. La subunidad B afianza la inmunidad antibacteriana de Dukoral con el agregado de inmunidad antitóxica que también es eficaz contra *Escherichia coli* enterotoxinógena y produce una enterotoxina termolábil; sin embargo, la protección agregada de inmunidad antitóxica es de duración corta que oscila entre 4 y 6 meses^{90,91}. Dukoral, administrada en forma de dos dosis cada dos semanas, es utilizada por los viajeros europeos y canadienses a fin de protegerse de la diarrea del turista producida por *E. coli* generador de LT. Si bien Dukoral fue autorizada de manera preliminar por la Organización Mundial de la Salud para la adquisición por parte de los organismos de las Naciones Unidas, en adelante se utilizó de manera escasa para el control del cólera endémico o epidémico con excepción de los proyectos de demostración.

Shanchol probó su capacidad para disminuir la incidencia del cólera en barrios altamente endémicos de Kolkata, India⁹². Dos dosis de Shanchol administradas con un intervalo de dos semanas confirieron una eficacia del 65% (IC del 95%, 52–74%) contra el cólera en general (en todas las edades combinadas)⁹². Sin embargo, hubo una clara jerarquía de protección en la que los niños de corta edad de entre 1 y 4 años (que padecen de la incidencia más alta de cólera) tuvieron los niveles más bajos de eficacia. En el curso de los cinco años de vigilancia, la eficacia fue del 75% en personas ≥ 15 años de edad, 68% en niños de entre 5 y 14 años de edad y 42% en niños de entre 1 y 4 años de edad al momento de la inscripción y vacunación⁹². La incidencia de la sensibilización inmunológica anterior fue clara durante el primer año del seguimiento cuando el cálculo puntual de la eficacia fue de tan solo 17% en niños de entre 1 y 4 años de edad pero fue del 81% en niños mayores de entre 5 y 14 años de edad y del 66% en individuos de 15 años de edad y más⁸². Shanchol fue eficaz también en un estudio de casos y controles intercalado tras una vacunación colectiva para controlar el cólera estacional en Guinea⁹³; este ensayo también destacó las complejidades de organizar campañas de vacunación reactiva y la conveniencia de un régimen de una sola dosis⁹⁴. Una dosis única de Shanchol se evaluó sistemáticamente en un ensayo clínico comparativo con placebo en el terreno en barrios pobres urbanos de Dhaka, Bangladesh. Una dosis única confirió protección del orden del 63% (IC 95%, -39–90%) entre niños cuyas edades oscilaron entre 5 y 14 años de edad, 56% (16–77) de protección entre personas ≥ 15 años de edad pero sólo eficacia del 16% (-49–53%) entre los niños <5 años de edad⁹⁵. La incidencia del cólera en los niños <5 años de edad (1,75/10⁵ días-persona) fue 8,3 veces más alta que entre niños de 5 a 14 años de edad (0,21/10⁵ días-persona) y 5,8 veces más alta que entre personas ≥ 15 años de edad, lo cual presuntamente podría indicar la posibilidad de que la dosis única de Shanchol funcione bien en personas con inmunidad espontánea previa considerable al cólera pero no en hospederos menos sensibilizados inmunológicamente⁹⁵. Hasta este momento, Shanchol ha sido la vacuna oral contra el cólera utilizada más extensamente de las reservas de la OMS de vacunas anticoléricas.

No se cuenta aún con datos sobre eficacia previa a la concesión de la licencia o efectividad posterior al licenciamiento para Euvichol. La licencia se concedió sobre la base de su identidad de formulación con Shanchol y la demostración clara de ausencia de inferioridad para suscitar la seroconversión de concentraciones séricas de anticuerpos vibriocidas⁸³. Euvichol recibió la autorización preliminar rápida de la OMS y ahora podrá ampliar la oferta de vacunas anticoléricas orales en el inventario de la OMS. En la tabla 2 se asume que Euvichol ofrecerá eficacia similar a la de Shanchol.

En junio de 2016, Vaxchora™ (cepa CVD 103-HgR) recibió la licencia de la FDA de los EE. UU. y ofrecerá en el mercado de los Estados Unidos y en el de otros países industrializados una vacuna anticolérica oral de dosis única, acción rápida (protección sólida clara en 8 a 10 días) para personas que inmunológicamente no han estado expuestas y que deben viajar con escaso preaviso a lugares de alto riesgo⁸⁵. CVD 103-HgR tiene una supresión del gen que codifica la

subunidad A enzimáticamente activa de la toxina colérica, sin modificar la subunidad B inmunogénica. Asimismo, posee un marcador de resistencia a Hg⁺⁺ insertado en hlyA, con lo cual inactiva la expresión de la hemolisina A. En individuos de países industrializados, una dosis oral única que contiene ~10⁸ unidades formadoras de colonias (ufc) de CVD 103-HgR se tolera bien, suscita la seroconversión de anticuerpos séricos vibriocidas en >90% de los vacunados, tiene sólo excreción modesta (del 18 al 25% tiene coprocultivos positivos 1 a 4 días después de la vacunación) y confiere 90% de eficacia contra la provocación con el *Vibrio cholerae* O1 del tipo de referencia al cabo de 10 días de la vacunación. Tras la provocación a los 3 meses subsiguientes a la ingestión de una dosis única, se registró una eficacia de la vacuna del orden del 80%³. Los estudios de provocación con Vaxchora en voluntarios identificaron la seroconversión de anticuerpos vibriocidas como un marcador de protección fuerte³.

CVD 103-HgR fue fabricada originalmente por el ahora desaparecido Instituto Suizo de Suero y Vacunas y comercializada con la marca comercial Orochol[®], en muchos países, y Mutacol[®], en Canadá. Esta formulación anterior protegió a voluntarios de la provocación con el *Vibrio cholerae* O1 de El Tor o el biotipo clásico y el serotipo Inaba u Ogawa y confirió protección de la provocación a los 8 días y hasta 6 meses después de la vacunación⁹⁶. Orochol E (~10⁹ ufc), con una formulación que contiene organismos vacunales un valor más alto en la escala logarítmica, se comercializó para uso en países en desarrollo⁹⁷. El motivo de una dosificación un valor más alto en la escala logarítmica para poblaciones en países en desarrollo es que la enteropatía ambiental, que es altamente prevalente en los niveles socioeconómicos bajos de la población más vulnerable al cólera y otras infecciones entéricas, reduce la respuesta inmunitaria a la vacuna oral elaborada con virus vivos. El número más alto de ufc por dosis supera esta barrera intestinal⁹⁸⁻¹⁰⁰. Se examinó la biología de la necesidad de una dosis más alta en poblaciones empobrecidas de países en desarrollo¹⁰¹.

Se evaluó Orochol E en un ensayo en el terreno con enmascaramiento doble aleatorizado con placebo a gran escala en los barrios del norte de Yakarta, donde el cólera era hiperendémico¹⁰². La aleatorización fue a nivel del individuo en el ensayo de Yakarta cuando la función crítica de la protección indirecta no se valoraba aún^{103, 104}. En este ámbito la vacuna no demostró protección marcada pero brevemente después de la inscripción y vacunación, la incidencia del cólera descendió >80% en lo que antiguamente era una ecología hiperendémica. Una interpretación es que la vacuna oral elaborada con virus vivos disminuyó la incidencia general en la comunidad hasta un punto en el que no fue posible demostrar la eficacia pero la carga del cólera disminuyó marcadamente durante cuatro años¹⁰². Más adelante en una vacunación reactiva, posterior a la concesión de la licencia, a cargo de la OMS durante una epidemia del cólera en Micronesia en la que se calculó una eficacia vacunal del 79%, se demostró la capacidad de Orochol E de proteger a poblaciones en países en desarrollo⁹⁷. Los ensayos clínicos comienzan con una formulación de dosis alta de CVD 103-HgR (PxVx0200) preparada por el fabricante de Vaxchora para explorar su utilidad para la vacunación reactiva^{85, 105}. En un estudio preliminar en Mali, África Occidental, una sola dosis de la formulación de dosis alta fue significativamente más inmunogénica en la estimulación de los anticuerpos vibriocidas séricos que una o dos dosis de Shanchol utilizadas como el comparador inmunológico¹⁰⁵.

Prevención y control

Agua potable y alimentos. Dado que los patógenos de la fiebre tifoidea suelen adquirirse por medio de la ingestión de agua o alimentos contaminados, se deben tomar precauciones entéricas cuando se reside en zonas endémicas o se viaja a ellas. Sólo se debe consumir agua tratada (ya sea hervida o tratada con sustancias químicas). Se deben evitar los alimentos que puedan estar contaminados con materia fecal (por ejemplo, verduras sin cocinar en ensaladas). Los viajeros en zonas con cólera endémico deben tener especial cuidado para no consumir platos de mariscos a menos que estén cocinados a alta temperatura.

Conclusión

Tanto para la prevención de la enfermedad en poblaciones de países con cólera endémico como para los viajeros provenientes de países industrializados a regiones con cólera endémico y epidémico, existen varias opciones de vacunas orales nuevas y mejoradas para prevenir la enfermedad colérica. El abastecimiento mundial de vacunas anticoléricas está en aumento también. El uso sensato de estas vacunas puede disminuir el riesgo de cólera en el mundo.

Referencias

1. Swerdlow DL, Mintz ED, Rodriguez M et al. Waterborne transmission of epidemic cholera in Trujillo, Peru: Lessons for a continent at risk. *Lancet* 1992;340:28-32.
2. Harris JB, LaRocque RC, Charles RC, Mazumder RN, Khan AI, Bardhan PK. Cholera's western front. *Lancet* 2010;376:1961-1965.
3. Chen WH, Cohen MB, Kirkpatrick BD et al. Single-Dose Live Oral Cholera Vaccine CVD 103-HgR Protects Against Human Experimental Infection with *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Clin Infect Dis* 2016;62:1329-1335.
4. Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:48-86.
5. Nair GB, Qadri F, Holmgren J et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2006;44:4211-4213.
6. Morita M, Ohnishi M, Arakawa E et al. Emergence and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype ctxB among travel-associated cases of cholera in Japan. *J Med Microbiol* 2010;59:708-712.
7. Mutreja A, Kim DW, Thomson NR et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 2011;477:462-465.
8. Mukhopadhyay AK, Takeda Y, Balakrish NG. Cholera outbreaks in the El Tor biotype era and the impact of the new El Tor variants. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014;379:17-47. doi: 10.1007/82_2014_363.:17-47.
9. Siddique AK, Nair GB, Alam M et al. El Tor cholera with severe disease: a new threat to Asia and beyond. *Epidemiol Infect* 2010;138:347-352.
10. Poirier MJ, Izurieta R, Malavade SS, McDonald MD. Re-emergence of Cholera in the Americas: Risks, Susceptibility, and Ecology. *J Glob Infect Dis* 2012;4:162-171.
11. Cerda R, Lee PT. Modern cholera in the Americas: an opportunistic societal infection. *Am J Public Health* 2013;103:1934-1937.
12. Glass RI, Becker S, Huq I et al. Endemic cholera in rural Bangladesh, 1966-1980. *Am J Epidemiol* 1982;116:959-970.
13. Nelson EJ, Harris JB, Morris JG, Jr., Calderwood SB, Camilli A. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:693-702.
14. Nelson EJ, Chowdhury A, Flynn J et al. Transmission of *Vibrio cholerae* is antagonized by lytic phage and entry into the aquatic environment. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000187.
15. Azurin JC, Kobari K, Barua D et al. A long-term carrier of cholera: cholera Dolores. *Bull World Health Organ* 1967;37:745-749.
16. Pierce NF, Banwell JG, Gorbach SL, Mitra RC, Mondal A. Convalescent carriers of *Vibrio cholerae*. Detection and detailed investigation. *Ann Intern Med* 1970;72:357-364.
17. Weissman JB, DeWitt WE, Thompson J et al. A case of cholera in Texas, 1973. *Am J Epidemiol* 1974;100:487-498.
18. Blake PA, Allegra DT, Snyder JD et al. Cholera--a possible endemic focus in the United States. *N Engl J Med* 1980;302:305-309.
19. Levine MM. Cholera in Louisiana: old problem, new light. *N Engl J Med* 1980;302:345-347.

20. Rogers RC, Cuffe RG, Cossins YM, Murphy DM, Bourke AT. The Queensland cholera incident of 1977. 2. The epidemiological investigation. *Bull World Health Organ* 1980;58:665-669.
21. Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 1996;274:2025-2031.
22. Blake PA. Epidemiology of cholera in the Americas. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;22:639-660.
23. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. *Lancet* 2004;363:223-233.
24. Ries AA, Vugia DJ, Beingolea L et al. Cholera in Piura, Peru: A modern urban epidemic. *J Infect Dis* 1992;166:1429-1433.
25. Blake PA, Rosenberg ML, Florencia J, Costa JB, do Prado Quintino L, Gangarosa EJ. Cholera in Portugal, 1974. II. Transmission by bottled mineral water. *Am J Epidemiol* 1977;105:344-348.
26. Lowry PW, Pavia AT, McFarland LM et al. Cholera in Louisiana. Widening spectrum of seafood vehicles. *Arch Intern Med* 1989;149:2079-2084.
27. St.Louis ME, Porter JD, Helal A et al. Epidemic cholera in West Africa: the role of food handling and high- risk foods. *Am J Epidemiol* 1990;131:719-728.
28. Cohen J, Schwartz T, Klasmer R, Pridan D, Ghalayini H, Davies AM. Epidemiological aspects of cholera El Tor outbreak in a non-endemic area. *Lancet* 1971;2:86-89.
29. Gunnlaugsson G, Einarsdottir J, Angulo FJ, Mentambanar SA, Passa A, Tauxe RV. Funerals during the 1994 cholera epidemic in Guinea-Bissau, West Africa: the need for disinfection of bodies of persons dying of cholera. *Epidemiol Infect* 1998;120:7-15.
30. McCarthy SA, Khambaty FM. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:2597-2601.
31. Schild S, Tamayo R, Nelson EJ, Qadri F, Calderwood SB, Camilli A. Genes induced late in infection increase fitness of *Vibrio cholerae* after release into the environment. *Cell Host Microbe* 2007;2:264-277.
32. Glass RI, Holmgren J, Haley CE et al. Predisposition for cholera of individuals with O blood group. Possible evolutionary significance. *Am J Epidemiol* 1985;121:791-796.
33. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP et al. Extension of the volunteer challenge model to study South American cholera in a population of volunteers predominantly with blood group antigen O. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:75-77.
34. Nalin DR, Levine MM, Rhead J et al. Cannabis, hypochlorhydria, and cholera. *Lancet* 1978;2:859-862.
35. Nalin DR, Levine RJ, Levine MM et al. Cholera, non-vibrio cholera, and stomach acid. *Lancet* 1978;2:856-859.
36. Mosley WH, Ahmad S, Benenson AS, Ahmed A. The relationship of vibriocidal antibody titre to susceptibility to cholera in family contacts of cholera patients. *Bull WHO* 1968;38:777-785.
37. Gitelson S. Gastrectomy, achlorhydria and cholera. *Isr J Med Sci* 1971;7:663-667.
38. Mosley WH, McCormack WM, Ahmed A. Report of the 1966-67 cholera field trial in rural East Pakistan. 2. Results of the serological surveys in the study population — the relationship of case rate to antibody titre and an estimate of the inapparent infection rate with *Vibrio cholerae*. *Bull WHO* 1969;40:187-197.
39. Clemens JD, Sack DA, Harris JR, et al. Field trial of cholera vaccines in Bangladesh: results from three year follow-up. *Lancet* 1990;335:270-273.
40. Levine M, Kaper J, Black RE, Clements M. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev* 1983;47:510-550.
41. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP et al. Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD 110, a delta zot delta ace derivative of el Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* 1993;168:1536-1540.
42. Silva TM, Schleupner MA, Tacket CO et al. New evidence for an inflammatory component in diarrhea caused by selected new, live attenuated cholera vaccines and by El Tor and O139 *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1996;64:2362-2364.
43. Stokes NR, Zhou X, Meltzer SJ, Kaper JB. Transcriptional responses of intestinal epithelial cells to infection with *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 2004;72:4240-4248.

44. Levine MM, Black RE, Clements ML, Nalin DR, Cisneros L, Finkelstein RA. Volunteer studies in development of vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli*: A review. In: Holme T, Holmgren J, Merson MH, Mollby R, eds. *Acute enteric infections in children. New prospects for treatment and prevention*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1981;443-459.
45. DiRita VJ. Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 1992;6:451-458.
46. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2833.
47. Thelin KH, Taylor RK. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect Immun* 1996;64:2853-2856.
48. Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor RK, Levine MM. Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J Exp Med* 1988;168:1487-1492.
49. Levine MM, Nalin DR, Craig JP et al. Immunity of cholera in man: relative role of antibacterial versus antitoxic immunity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979;73:3-9.
50. Levine MM, Black RE, Clements ML, Cisneros L, Nalin DR, Young CR. Duration of infection-derived immunity to cholera. *J Infect Dis* 1981;143:818-820.
51. Clemens JD, van Loon F, Sack DA et al. Biotype as determinant of natural immunising effect of cholera. *Lancet* 1991;337:883-884.
52. Woodward WE. Cholera reinfection in man. *J Infect Dis* 1971;123:61-66.
53. Clements ML, Levine MM, Young CR et al. Magnitude, kinetics, and duration of vibriocidal antibody responses in North Americans after ingestion of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* 1982;145:465-473.
54. Levine MM, Young CR, Hughes TP et al. Duration of serum antitoxin response following *Vibrio cholerae* infection in North Americans: relevance for seroepidemiology. *Am J Epidemiol* 1981;114:348-354.
55. Losonsky GA, Tacket CO, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM. Secondary *Vibrio cholerae*-specific cellular antibody responses following wild-type homologous challenge in people vaccinated with CVD 103-HgR live oral cholera vaccine: Changes with time and lack of correlation with protection. *Infect Immun* 1993;61:729-733.
56. Glass RI, Svennerholm AM, Khan MR, Huda S, Huq MI, Holmgren J. Seroepidemiological studies of El Tor cholera in Bangladesh: association of serum antibody levels with protection. *J Infect Dis* 1985;151:236-242.
57. Harris JB, LaRocque RC, Chowdhury F et al. Susceptibility to *Vibrio cholerae* infection in a cohort of household contacts of patients with cholera in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e221.
58. Chowdhury F, Khan AI, Harris JB et al. A comparison of clinical and immunologic features in children and older patients hospitalized with severe cholera in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:986-992.
59. Losonsky GA, Lim Y, Motamedi P et al. Vibriocidal antibody responses in North American volunteers exposed to wild-type or vaccine *Vibrio cholerae* O139: specificity and relevance to immunity. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:264-269.
60. Rennels MB, Levine MM, Daya V, Angle P, Young C. Selective vs. nonselective media and direct plating vs. enrichment technique in isolation of *Vibrio cholerae*: recommendations for clinical laboratories. *J Infect Dis* 1980;142:328-331.
61. Harris JR, Cavallaro EC, de Nobrega AA et al. Field evaluation of crystal VC Rapid Dipstick test for cholera during a cholera outbreak in Guinea-Bissau. *Trop Med Int Health* 2009;14:1117-1121.
62. Kalluri P, Naheed A, Rahman S et al. Evaluation of three rapid diagnostic tests for cholera: does the skill level of the technician matter? *Trop Med Int Health* 2006;11:49-55.
63. Hasan JA, Huq A, Tamplin ML, Siebeling RJ, Colwell RR. A novel kit for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1. *J Clin Microbiol* 1994;32:249-252.
64. Seas C, DuPont HL, Valdez LM, Gotuzzo E. Practical guidelines for the treatment of cholera Practical guidelines for the treatment of cholera. *Drugs* 1996;51:966-973.
65. Mahalanabis D, Choudhuri AB, Bagchi NG, Bhattacharya AK, Simpson TW. Oral fluid therapy of cholera among Bangladesh refugees. *Johns Hopkins Med J* 1973;132:197-205.
66. Siddique AK, Salam A, Islam MS et al. Why treatment centres failed to prevent cholera deaths among Rwandan refugees in Goma, Zaire. *Lancet* 1995;345:359-361.

67. Mason PR. Zimbabwe experiences the worst epidemic of cholera in Africa. *J Infect Dev Ctries* 2009;3:148-151.
68. Carpenter CCJ. The treatment of cholera: Clinical science at the bedside. *J Infect Dis* 1992;166:2-14.
69. Molla AM, Sarker SA, Hossain M, Molla A, Greenough WB3. Rice-powder electrolyte solution as oral-therapy in diarrhoea due to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Lancet* 1982;1:1317-1319.
70. Hossain MS, Salam MA, Rabbani GH, Kabir I, Biswas R, Mahalanabis D. Rice-ORS versus glucose-ORS in management of severe cholera due to *Vibrio cholerae* O139 Bengal: a randomized, controlled clinical trial. *J Health Popul Nutr* 2003;21:325-331.
71. Murphy C, Hahn S, Volmink J. Reduced osmolarity oral rehydration solution for treating cholera. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;CD003754.
72. Gotuzzo E, Seas C, Echevarria J, Carrillo C, Mostorino R, Ruiz R. Ciprofloxacin for the treatment of cholera: a randomized, double-blind, controlled clinical trial of a single daily dose in Peruvian adults Ciprofloxacin for the treatment of cholera: a randomized, double-blind, controlled clinical trial of a single daily dose in Peruvian adults. *Clin Infect Dis* 1995;20:1485-1490.
73. Saha D, Khan WA, Karim MM, Chowdhury HR, Salam MA, Bennish ML. Single-dose ciprofloxacin versus 12-dose erythromycin for childhood cholera: a randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1085-1093.
74. Saha D, Karim MM, Khan WA, Ahmed S, Salam MA, Bennish ML. Single-dose azithromycin for the treatment of cholera in adults. *N Engl J Med* 2006;354:2452-2462.
75. Khan WA, Bennish ML, Seas C et al. Randomised controlled comparison of single-dose ciprofloxacin and doxycycline for cholera caused by *Vibrio cholerae* 01 or 0139. *Lancet* 1996;348:296-300.
76. Khan WA, Saha D, Rahman A, Salam MA, Bogaerts J, Bennish ML. Comparison of single-dose azithromycin and 12-dose, 3-day erythromycin for childhood cholera: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2002;360:1722-1727.
77. Nair GB, Shimada T, Kurazono H et al. Characterization of phenotypic, serological, and toxigenic traits of *Vibrio cholerae* O139 bengal. *J Clin Microbiol* 1994;32:2775-2779.
78. Alam AN, Alam NH, Ahmed T, Sack DA. Randomised double blind trial of single dose doxycycline for treating cholera in adults. *BMJ* 1990;300:1619-1621.
79. Sanchez JL, Vasquez B, Begue RE et al. Protective efficacy of oral whole-cell/recombinant-B-subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet* 1994;344:1273-1276.
80. Taylor DN, Cardenas V, Sanchez JL et al. Two year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit (WC/rBS) cholera vaccine in Peru. *J Infect Dis* 2000;181:1667-1673.
81. Kanungo S, Lopez AL, Ali M et al. Vibriocidal antibody responses to a bivalent killed whole-cell oral cholera vaccine in a phase III trial in Kolkata, India. *PLoS ONE* 2014;9:e96499.
82. Sur D, Kanungo S, Sah B et al. Efficacy of a low-cost, inactivated whole-cell oral cholera vaccine: results from 3 years of follow-up of a randomized, controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1289.
83. Baik YO, Choi SK, Olveda RM et al. A randomized, non-inferiority trial comparing two bivalent killed, whole cell, oral cholera vaccines (Euvichol vs Shanchol) in the Philippines. *Vaccine* 2015;33:6360-6365.
84. Levine MM, Kaper JB. Live oral cholera vaccine: from principle to product. *Bull Inst Pasteur* 1995;93:243-253.
85. Levine MM, Chen WH, Kaper JB, Lock M, Danzig L, Gurwith M. PaxVax CVD 103-HgR single-dose live oral cholera vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2017;16:197-213.
86. Black RE, Levine MM, Clements ML, Young CR, Svennerholm AM, Holmgren J. Protective efficacy in humans of killed whole-vibrio oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun* 1987;55:1116-1120.
87. Sanchez J, Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:481-485.
88. Lucas ME, Deen JL, von SL et al. Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *N Engl J Med* 2005;352:757-767.
89. Khatib AM, Ali M, von SL et al. Effectiveness of an oral cholera vaccine in Zanzibar: findings from a mass vaccination campaign and observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2012;12:837-844.

90. Clemens JD, Sack DA, Harris JR et al. Cross-protection by B subunit-whole cell cholera vaccine against diarrhea associated with heat-labile toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: Results of a large-scale field trial. *J Infect Dis* 1988;158:372-377.
91. Peltola H, Siitonen A, Kyrönseppä H et al. Prevention of travellers' diarrhoea by oral B-subunit/whole-cell cholera vaccine. *Lancet* 1991;338:1285-1289.
92. Bhattacharya SK, Sur D, Ali M et al. 5 year efficacy of a bivalent killed whole-cell oral cholera vaccine in Kolkata, India: a cluster-randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2013;13:1050-1056.
93. Luquero FJ, Grout L, Ciglenecki I et al. Use of *Vibrio cholerae* vaccine in an outbreak in Guinea. *N Engl J Med* 2014;370:2111-2120.
94. Ciglenecki I, Sakoba K, Luquero FJ et al. Feasibility of mass vaccination campaign with oral cholera vaccines in response to an outbreak in Guinea. *Plos Med* 2013;10:e1001512.
95. Qadri F, Wierzba TF, Ali M et al. Efficacy of a Single-Dose, Inactivated Oral Cholera Vaccine in Bangladesh. *N Engl J Med* 2016;374:1723-1732.
96. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP et al. Onset and duration of protective immunity in challenged volunteers after vaccination with live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *J Infect Dis* 1992;166:837-841.
97. Calain P, Chaine JP, Johnson E et al. Can oral cholera vaccination play a role in controlling a cholera outbreak? *Vaccine* 2004;22:2444-2451.
98. Suharyono, Simanjuntak C, Witham N et al. Safety and immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in 5-9-year-old Indonesian children. *Lancet* 1992;340:689-694.
99. Gotuzzo E, Butron B, Seas C et al. Safety, immunogenicity, and excretion pattern of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in Peruvian adults of high and low socioeconomic levels. *Infect Immun* 1993;61:3994-3997.
100. Su-Areawaratana P, Singharaj P, Taylor DN et al. Safety and immunogenicity of different immunization regimens of CVD 103-HgR live oral cholera vaccine in soldiers and civilians in Thailand. *J Infect Dis* 1992;165:1042-1048.
101. Levine MM. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. *BMC Biol* 2010;8:129.:129.
102. Richie E, Punjabi NH, Sidharta Y et al. Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine* 2000;18:2399-2410.
103. Ali M, Emch M, von Seidlein L et al. Herd immunity conferred by killed oral cholera vaccines in Bangladesh: a reanalysis. *Lancet* 2005;366:44-49.
104. Longini IM, Jr., Nizam A, Ali M, Yunus M, Shenvi N, Clemens JD. Controlling endemic cholera with oral vaccines. *Plos Med* 2007;4:e336.
105. Sow SO, Tapia MD, Chen WH et al. A randomized, placebo-controlled, double-blind Phase 2 trial comparing the reactogenicity and immunogenicity of a single $\geq 2 \times 10^8$ colony forming units [cfu] standard-dose versus a $\geq 2 \times 10^9$ cfu high-dose of CVD 103-HgR live attenuated oral cholera vaccine, with Shanchol inactivated oral vaccine as an open label immunologic comparator. *Clin Vaccine Immunol* 2017;CVI-17.
106. van Loon FP, Clemens JD, Chakraborty J et al. Field trial of inactivated oral cholera vaccines in Bangladesh: results from 5 years of follow-up. *Vaccine* 1996;14:162-166.
107. Lagos R, San Martin O, Wasserman SS et al. Palatability, reactogenicity and immunogenicity of engineered live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in Chilean infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:624-630.
108. Lagos R, Losonsky G, Abrego P et al. Tolerancia, inmunogenicidad, excreción y transmisión de la vacuna anti-colera oral viva-atenuada, CVD 103-HgR, estudio pareado de doble ciego en niños Chilenos de 24 a 59 meses. *Bol Hosp Infant Mex* 1996;53:214-220.
109. Simanjuntak CH, O'Hanley P, Punjabi NH et al. The safety, immunogenicity, and transmissibility of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in 24 to 59 month old Indonesian children. *J Infect Dis* 1993;168:1169-1176.
110. Hashim R, Khatib AM, Enwere G et al. Safety of the Recombinant Cholera Toxin B Subunit, Killed Whole-Cell (rBS-WC) Oral Cholera Vaccine in Pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1743.
111. Grout L, Martinez-Pino I, Ciglenecki I et al. Pregnancy Outcomes after a Mass Vaccination Campaign with an Oral Cholera Vaccine in Guinea: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0004274.
112. Ivers LC, Charles RC, Hilaire IJ et al. Immunogenicity of the Bivalent Oral Cholera Vaccine Shanchol in Haitian Adults With HIV Infection. *J Infect Dis* 2015;212:779-783.