

El cólera: una enfermedad infecciosa reemergente. El candidato vacunal cv 638, una herramienta para su prevención

Adrian Zelada-Valdés,* Talena Yamilé Ledón-Pérez y Rafael Alfredo Fando-Calzada.****

Policlínico Mario Muñoz Monroy Avenida 269 No. 21807. Wajay, Municipio Boyeros. La Habana, Cuba.

**Departamento de Biología Molecular, Área de Investigaciones de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. pablo.estrada@infomed.sld.cu

Recibido: 10 de julio de 2014.

Aceptado: 9 de febrero de 2015.

Palabras clave: cólera, pandemia de cólera, vacuna, CV 638, diarrea, VOC

Key words: cholera, pandemic of cholera, vaccine, CV 638, diarrhea, OCV

RESUMEN. Este artículo tiene como objetivo realizar una revisión de la enfermedad del cólera y del candidato vacunal CV 638. El cólera es una enfermedad infecciosa reemergente, caracterizada por diarreas profusas, con apariencia de agua de arroz, causada por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con la bacteria *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139. El serogrupo O1 es el causante de la séptima pandemia. La incidencia de diversos factores como son los desastres naturales, sistemas sanitarios deficientes, la poca accesibilidad al agua potable, ha favorecido a que cada año se reporten entre 3 y 5 millones de personas que sufren esta enfermedad, con una alta cifra de defunciones. Además, en muchas regiones del planeta, el cólera se ha vuelto endémico, lo que ha provocado grandes pérdidas en la macro y microeconomía de los países afectados. Asimismo, se ha reportado un aumento de la resistencia a los agentes antimicrobianos usados tradicionalmente para combatir la enfermedad. Por tal razón, desde el año 2005 la Organización Mundial de la Salud ha recomendado el uso de vacunas orales como una herramienta para el control de la enfermedad en ciertas situaciones endémicas y epidémicas. En Cuba, a raíz de la epidemia de cólera que azotó a Perú en 1991, se obtuvo el candidato vacunal CV 638, el cual ha demostrado que es seguro, inmunogénico y protector.

ABSTRACT. This article aims to perform a review of the cholera and vaccine candidate CV 638. Cholera is a reemerging infectious disease characterized by profuse diarrhea with rice water appearance, caused by ingestion of food or water contaminated with the bacterium *Vibrio cholerae* of the O1 and O139 serogroups. Strains of the O1 serogroup are responsible for the seventh cholera pandemic. The incidence of various factors such as natural disasters, weak health systems, poor accessibility to potable water and refugee camps, has meant that each year is reported that between 3 and 5 million people suffer from this disease, with a high number of deaths. Moreover, in many regions of the world, cholera has become endemic, which has caused major losses in macro- and microeconomics of the countries concerned. It has also reported an increase in antimicrobial resistance, so since 2005 the World Health Organization has recommended the use of oral vaccines as an adjunct to the control of the disease in certain endemic and epidemic situations. In Cuba following the cholera epidemic that hit Peru in 1991, it has been developing the vaccine candidate *Vibrio cholera* 638 which has been shown to be safe, immunogenic and protective.

INTRODUCCIÓN

Anualmente, se reportan alrededor de 4 000 000 000 de casos con diarrea en todo el mundo, de los cuales aproximadamente 2,2 000 000 000 fallecen.¹ Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) constituyen la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años.¹ Alrededor de la mitad de los casos son causados por bacterias patógenas que producen enterotoxinas, siendo el cólera la más grave de las enteropatías enterotoxigénicas por provocar deshidratación severa, desequilibrio hidromineral, hipovolemia, shock e insuficiencia renal aguda.¹

El cólera es un ejemplo clásico de EDA infecciosa con diarrea secretoria, la cual ha azotado muchas regiones del mundo. En la actualidad, continúa siendo un grave problema de salud a nivel mundial que afecta fundamentalmente a países en desarrollo.¹ Es una infección caracterizada por diarreas profusas, con apariencia de agua de arroz, causada por la ingestión de alimentos o agua contaminada con la bacteria *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139.

El cólera forma parte de las enfermedades infecciosas reemergentes, debido a fallas o negligencias en los sistemas sanitarios y en la vigilancia epidemiológica de los países donde se han reportado brotes epidémicos.²

Después de siete pandemias a nivel mundial, se ha determinado que esta enfermedad infecciosa aparece principalmente como consecuencia de situaciones de contingencia tales como tormentas tropicales, inundaciones, terremotos, maremotos, sequías, así como en campamentos de refugiados o desplazados a causa de las guerras. Sumado a esto, existen regiones en África subsahariana, Asia y América Latina que presentan cólera endémico debido a factores que favorecen su permanencia como el medio ambiente, el hacinamiento, la escasez del agua potable, la contaminación de los alimentos y la eliminación inapropiada de los desechos y las deposiciones humanas o por la existencia de infraestructuras sanitarias inadecuadas.³

En 2010, se produjo un terremoto en Haití, que condicionó de forma indirecta la aparición del cólera en proporciones epidémicas en esta nación caribeña. Posteriormente, Cuba, libre de esta enfermedad en los últimos 130 años, sufrió brotes epidémicos de cólera que afectaron varias provincias de la isla.

Este artículo tuvo como objetivo realizar una revisión del estado actual del cólera y el candidato vacunal CV 638.

El cólera: agente causal, patogénesis y desarrollo de la enfermedad

Vibrio cholerae es un bacilo corto, gramnegativo, anaerobio facultativo, perteneciente al género *Vibrio*, de la familia *Vibrionaceae*. El *Vibrio cholerae* requiere diversos factores ambientales para su crecimiento como una temperatura óptima de 37 °C y pH óptimo entre 7,0 y 8,0.^{4,5}

El vibrión colérico ha sido aislado en lagos, ríos y zonas costeras en regiones templadas y tropicales. Además, se ha identificado en moluscos y en el exoesqueleto de crustáceos.^{5,6} Existen más de 200 serogrupos descritos, sin embargo, los serogrupos O1 y O139 son los que presentan mayor importancia médica por estar asociados a epidemias y pandemias.^{5,7}

Por otra parte, el serogrupo O1 es clasificado en dos biotipos: Clásico y El Tor, sobre la base de diferencias bioquímicas, que no son aplicables para el serogrupo O139, aunque existen características microbiológicas similares que vinculan a los dos serogrupos.^{8,9} Debido principalmente a diferencias antigénicas en el polisacárido O, ambos biotipos de *V. cholerae* O1 pueden presentarse con uno de los serotipos siguientes: Ogawa, Inaba o Hikojima, este último en mucha menor proporción.^{3,9}

El cólera se transmite por vía fecal-oral y usualmente es provocado por la ingestión de un elevado número de organismos (10^8 – 10^{11}), aunque en individuos con baja acidez estomacal la dosis infectiva puede ser más baja.¹⁰ La patogénesis de esta enfermedad es un proceso complejo e implica una serie de factores que permiten al patógeno alcanzar y colonizar el epitelio del intestino delgado y producir la toxina colérica, codificada por los genes *ctxAB*, que es directamente responsable de la manifestación de la diarrea. Existen, además, otros productos

génicos que realizan una acción sinérgica durante la colonización del intestino del hospedero susceptible.^{9,11,12}

El cólera presenta un breve periodo de incubación, que fluctúa entre dos horas y cinco días. La toxina colérica provoca una diarrea copiosa, indolora y acuosa que puede conducir con rapidez a una deshidratación grave y a la muerte. Si no se trata oportunamente puede conducir al shock hipovolémico, acidosis metabólica e insuficiencia renal.³ Por su elevada tasa de letalidad, el cólera es un gran problema de salud en muchas regiones del planeta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS PANDEMIAS DE CÓLERA REGISTRADAS EN LA HISTORIA

Primera pandemia (1817-1824) La primera pandemia fue de origen asiático. Comenzó en áreas adyacentes al delta de los ríos Bengal y Ganges en la India. En el mismo año, aparecieron nuevos brotes en otras regiones de la India. Entre marzo y mayo de 1820, se observaron brotes en Tailandia y Las Filipinas, respectivamente. En la primavera de 1821, la enfermedad se reportó en Java y sucesivamente fueron apareciendo nuevos brotes en países del oeste y este de Asia como Siria y Japón. Sin embargo, no se propagó a Europa, ni a la región de América.^{4,13}

Segunda pandemia (1829-1850) En 1831, entra en Europa, aunque originalmente había comenzado en la India en 1826 y debido al movimiento de rutina de las compañías militares, en 1829 aparece en Rusia. Así, se va trasladando hacia el medio este y oeste de Europa. Finalmente, aparece en América del Norte: Quebec, Montreal y Nueva York. Luego, se reportan brotes en Cartagena de Indias, México, Guatemala, Nicaragua y Cuba.^{4,13,14}

Tercera pandemia (1852-1860) El tercer gran brote de cólera una vez más comenzó en la India y avanzó mucho más allá de sus fronteras, llegando a Persia, Mesopotamia y Europa en 1853. El continente americano fue una vez más víctima del cólera, el cual afectó a los Estados Unidos, Brasil, Cuba, Jamaica y otras islas del Caribe. En Rusia más de un millón de personas murieron a causa de esta enfermedad.^{4,13}

En Londres, más de 10 000 personas fallecieron, y se reportaron alrededor de 23 000 defunciones en toda Gran Bretaña. Por este tiempo, el médico británico John Snow descubrió la transmisión hídrica del cólera. Poco antes que arribara la epidemia, uno de los proveedores de agua de Londres transfirió la toma que tenía en el río Támesis a un punto ubicado aguas arriba de la ciudad, donde el agua era más limpia. Por casualidad, este hecho creó un grupo de pruebas de control que permitió al Dr. Snow llevar a cabo un estudio comparativo en el cual observó un denominador común entre todas las muertes de cólera: el pozo de la calle Broad. Cuando se abrió la tapa de dicho pozo, se encontró que el agua estaba contaminada.^{4,13} Sobre la base de sus observaciones epidemiológicas, el Dr. Snow pasó a la historia de la epidemiología mundial. Esta pandemia tuvo los más elevados niveles de mortalidad de las epidemias del siglo XIX.^{4,13,15}

Cuarta pandemia (1863-1875) Después de iniciarse otra vez en la India, atravesó desde el oeste de Asia hasta las tierras del Mediterráneo. Asimismo, afectó el sur de Arabia, Somalia, Etiopía, Egipto y el norte de África. Invadió a muchos países de Europa y América, llegando a Cuba en 1867 por tercera y última vez en el siglo XIX.¹³

Quinta pandemia (1881-1896). Comenzó en el sur de Asia en 1881, más tarde llegó a Java, Borneo e islas Filipinas. Luego llega a Arabia, Egipto y cruzó el Mediterráneo hasta

llegar a Italia, Francia y España. En 1886, cruzó el Atlántico y arribó a Argentina y a Chile en 1887. Durante esta pandemia el genial médico alemán Robert Koch (1843-1910) descubrió el agente etiológico del cólera, el *Vibrio cholerae*.¹⁵

Sexta pandemia (1899-1923). En esta ocasión, el cólera no afectó a las Américas, Pero sí afecto en gran medida a Asia y Europa. Durante la primera guerra mundial, entre los meses de julio a septiembre de 1915, el ejército austro-húngaro registró 26 000 casos, con 15000 defunciones.⁴

Séptima pandemia (1961). Esta última pandemia apareció a partir de un brote en la isla de Sulawesi, en el archipiélago de Indonesia. Luego, se extendió a Java, Sarawak y Borneo. También afectó las islas Filipinas, Taiwán, Tailandia, Burma, Cambodia, Vietnam y Bangladesh. En 1964, invadió a la India y en 1965 a Paquistán. Meses más tarde irrumpió en Afganistán, Irán y en las repúblicas de la antigua Unión Soviética. A su vez, se fue propagando a otras áreas geográficas como Siria, Líbano, Jordania, Dubai, Arabia Saudita y el este del África sub-sahariana donde ahora es endémico. En 1982 y 1983 hubo grandes brotes en las islas Truk. En Estados Unidos, hasta 1990, se habían reportado 50 casos y de todos los países afectados, Perú es el que mayor cantidad de fallecidos había notificado.¹⁶

EL CÓLERA EN CUBA

Primera epidemia del cólera en Cuba En 1833, hizo su entrada en La Habana la primera epidemia de cólera en Cuba. Solo en la capital, hubo más de 9000 víctimas fatales, entre ellas, el famoso pintor francés Juan Bautista Vermeil de Beaumé (1784-1833), autor de los cuadros históricos del Templo, así como la hija del propio Dr. Romay. Se calcula que en el resto de la isla el número de fallecidos se triplicó.¹⁷

Segunda epidemia del cólera en Cuba En 1850 y procedente de Estados Unidos, volvió a entrar el cólera en Cuba. La suspensión de la cuarentena a los buques provocó que la enfermedad reapareciera. El 31 de marzo de 1850, se realizó el diagnóstico del primer caso de cólera en su segunda entrada al país y hasta el 31 de diciembre de 1854, se produjeron en La Habana 9348 casos, con 6180 defunciones. En el resto del país fallecieron aproximadamente 18000 personas.¹⁷

Tercera epidemia del cólera en Cuba En 1867, entró el cólera al país por última vez en el siglo XIX, siendo parte de la cuarta pandemia. En esta tercera epidemia, el Dr. Ambrosio González del Valle y Cañizo (1822-1913), padre de las estadísticas sanitarias en Cuba, informó 5940 fallecidos. A partir de 1872, las defunciones fueron decayendo por año, con lo que llegó a registrarse en 10 años (1872 a 1882) 86 muertos por el cólera a lo largo del país.¹⁷

SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA MUNDIAL

El *Vibrio cholerae* serogrupo O1, biotipo El Tor, es el agente causal de la séptima pandemia, iniciada en 1961 y ha continuado su propagación hacia todas las regiones del mundo, afectando entre 3 y 5 millones de personas cada año, de los cuales 120 000 mueren.^{3,18} El cólera en los países en desarrollo es a menudo descrito como una enfermedad infecciosa reemergente, que provoca grandes pérdidas tanto en la micro como en la macroeconomía.¹⁹ Se manifiesta en dos formas epidemiológicas: la endémica y la epidémica.^{18,19}

El cólera endémico es una enfermedad recurrente que afecta a la misma población y la fuente de infección es a menudo un reservorio marino (moluscos y copépodos).²⁰⁻²² Debido al patrón repetido de las especies circulantes, las poblaciones afectadas desarrollan inmunidad natural contra el cólera, que aumenta con la edad. Las tasas más elevadas de incidencia y la mayor gravedad clínica de la enfermedad corresponden a niños menores de 5 años, sin anterior exposición al microorganismo.²³

Las epidemias de cólera se producen normalmente de forma impredecible en una población que normalmente no experimenta cólera y la fuente de infección es a menudo exógena (tal como una fuente contaminada de agua potable). Tales poblaciones carecen de inmunidad natural pre-existente y en consecuencia, la incidencia y la gravedad del cólera en esta configuración tiende a ser independiente de la edad.^{23,24} Los brotes epidémicos de cólera ocurren frecuentemente después de guerras, desastres naturales y otras situaciones de contingencia o infraestructuras sanitarias inadecuadas.

A finales de la década de los 90 del siglo xx, hubo grandes brotes de cólera que fueron influenciados por los eventos climatológicos que produjo el fenómeno de “El Niño”. Debido a las intensas lluvias y vientos característicos que provocaron inundaciones y deslave de tierras, se afectó no solo la infraestructura de muchos países en desarrollo, sino también, sus servicios médicos, así como la distribución de agua potable y la alimentación de la población.^{3,16,25} En América Latina, el fenómeno natural fue un factor determinante en la aparición de un brote epidémico de cólera en Perú, que se extendió hacia otros países.¹⁶

A su vez, otras naciones de otras latitudes como Afganistán,²⁶ Irak,²⁷ Irán,²⁸ Indonesia,²⁹ Vietnam,³⁰ India,^{31,32} y Bangladesh^{33,34} han presentado brotes de cólera graves. También, países del continente africano han sido afectados por brotes de cólera, entre ellos: Sudán,³⁵ Mozambique,³⁶ Guinea,³⁷ Angola,¹⁹ Zimbabwe,³⁸ Tanzania, Kenia y Uganda.^{38,39}

La tasa de letalidad por esta enfermedad diarreica varía en diversos contextos urbanos y rurales en el mundo. Las tasas más elevadas se constatan durante las epidemias y brotes en los países que presentan un índice mayor de pobreza extrema. En 2008, la tasa global de letalidad por cólera fue de aproximadamente 2,7 %.²⁷ En el 2011, la OMS reportó casos de cólera en 58 países de todos los continentes, con un total de casos de 5 089 894 y 7 816 defunciones.⁴⁰

SITUACIÓN ACTUAL DEL CÓLERA EN CUBA

No se puede hablar de un brote de cólera en Cuba, sin antes hacer alusión a Haití. En enero de 2010, la isla de La Española sufrió un terremoto, circunscrito a la geografía haitiana, sin afectar a la República Dominicana. Este fenómeno natural agudizó la situación existente en ese país caribeño, tanto en su economía, su infraestructura y sus servicios sanitarios.⁴¹

Estos factores y otros externos propiciaron la aparición de un brote epidémico de cólera a finales del mes de octubre del mismo año en la localidad de Artibonito. Después de una centuria sin casos reportados de cólera en ese país, las autoridades sanitarias confirmaron la situación epidemiológica el 21 de octubre de 2010.⁴²

Por otra parte, se realizó una investigación epidemiológica para determinar si la enfermedad se había iniciado por la presencia de un batallón de soldados nepaleses que cumplían el servicio de la Misión de Estabilización de las Naciones Unidas en Haití (MINUSTAH).⁴³ El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) sito en Atlanta, Estados Unidos, notificó que las muestras de ADN tomadas de haitianos afectados, demostraron pertenecer a una cepa de la bacteria *V. cholerae* identificada como serogrupo O1, biotipo El Tor serotipo *Ogawa*. Se obtuvo evidencias de corte filogenético que indicaron que las cepas de *V. cholerae*, presente en el brote de cólera en Haití, tenían una relación con las cepas circulantes en el sudeste asiático.⁴² Se concluyó que el inicio del cólera en Haití no fue el resultado directo de los factores climatológicos o del terremoto, sino que fue una consecuencia directa de las deficiencias de las medidas

higiénico-sanitarias de las tropas nepaleses, presentes en las cercanías del río Meyé donde se reportaron los primeros casos de la enfermedad.⁴³

El 3 de diciembre, el Ministerio de Salud Pública y Población (MSPP) de Haití reportó 91 770 casos de cólera en los 10 departamentos en que está dividido el país; asimismo, en la capital 43 243 pacientes habían sido hospitalizados y 2071 habían fallecido.⁴⁴

A pesar de la ayuda y la cooperación multisectorial haitiana, la colaboración conjunta de la OMS, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el CDC y el apoyo de Cuba y otros gobiernos latinoamericanos, las infraestructuras de Haití para el cuidado de la salud, el agua y el saneamiento fueron severamente dañados, lo que complicó aún más la situación precaria existente en el país y ha imposibilitado la erradicación del cólera en esta isla caribeña. Como respuesta a esta situación, se confeccionó un Plan Nacional de Acción para la eliminación del cólera en Haití, entre los años 2013–2022.⁴⁵

En 2012, a pesar de las medidas higiénico-epidemiológicas tomadas por Cuba para la prevención y evitar la introducción del cólera, en el archipiélago cubano fueron confirmados 417 casos de EDA por *V. cholerae* y tres fallecidos en un brote epidémico que comenzó en la provincia oriental de Granma, el cual fue oficialmente dado por concluido el día 28 de agosto, con una duración aproximada de dos meses.⁴⁶⁻⁴⁸ Se determinó que la cepa causante de este brote de cólera en Cuba compartía el serotipo y biotipo, así como diferentes elementos genéticos y un patrón de susceptibilidad a antibióticos similares a las aisladas en Haití.^{47,49}

Los factores que hayan favorecido la aparición de este brote epidémico en Cuba después de más de un siglo son hipotéticos. El flujo de personal entre ambas islas caribeñas pudo ser un factor importante. Sin embargo, otros factores pudieran ser relevantes como es el hecho de que ambas naciones presentan un área común de pesca. Al estar contaminadas la flora marina de las costas haitianas la fauna marina (fundamentalmente los mariscos, copépodos y peces) podría estar infectada con el vibrión colérico,^{5,6} por lo que pudo haber llegado a las costas cubanas como resultado del arrastre de las corrientes marinas. A su vez, los barcos mercantes que hayan hecho escala o anclado en las costas haitianas podrían haber transportado en las aguas de lastre, plantas o copépodos que en su superficie portaran dicha bacteria,^{5,6} ya que los primeros casos se reportaron en la provincia de Granma. Esta provincia no solo presenta costas en el Golfo del Guacanayabo, sino que presenta la segunda mayor cuenca de la isla (cuenca del río Cauto), que desemboca en dicho golfo. No obstante, hasta el momento no se han identificado los eventos que originaron el brote epidémico de cólera en 2012.^{4,13}

El 23 de agosto de 2013, Cuba notificó a la OPS más de 163 casos de cólera en las provincias de La Habana, Santiago de Cuba y Camagüey, así como en otros municipios.⁴⁹ Este segundo brote epidémico motivó una intensificación de las medidas higiénico-sanitarias en todos los niveles de la salud pública, así como la optimización de las infraestructuras sanitarias y un programa de educación sanitaria a la población cubana como piedra angular para el éxito en el control epidemiológico y erradicación de esta enfermedad.

TRATAMIENTO

La tasa de letalidad del cólera puede ser muy elevada con más del 70 % de los casos reportados, si no se es enérgico en su tratamiento.⁹ A diferencia de otras enfermedades infecciosas el tratamiento con antimicrobianos es la segunda línea terapéutica, debido a que se debe realizar primeramente la reposición de líquidos por vía oral o endovenosa, en dependencia del grado de deshidratación que presente el paciente. A los pacientes con deshidratación leve o moderada se les administrará disolución de sales de rehidratación oral (SRO) y a los que presenten deshidratación crítica solución de Ringer lactato.⁵⁰⁻⁵²

La terapia con antibióticos se utiliza como segunda línea para reducir el volumen de las heces, disminuir la duración de la enfermedad y la excreción del vibrión colérico de 1 a 2 días. En los últimos años, se ha utilizado la doxiciclina como primera línea de tratamiento contra el cólera en

niños y adultos a 6 mg/kg y 300 mg/kg de peso; respectivamente. Otras alternativas de tratamientos farmacológicos emplean: azitromicina, ciprofloxacina, eritromicina, entre otros.^{9,12,18,53}

A finales de la década de los 70 del pasado siglo, se han reportado cepas de *V. cholerae* resistentes a varios antimicrobianos, fundamentalmente al grupo de las quinolonas y fluoroquinolonas, así como a la tetraciclina, cloramfenicol, TMP-SMX (TMP: trimetoprim, SMX: sulfametoxazol), estreptomina, gentamicina, kanamicina, ampicilina y cefotaxima.^{9,54,55}

Sumado a este precedente, la aparición en nuevas regiones del planeta del cólera endémico ha dado lugar a la utilización de vacunas orales contra el *Vibrio cholerae* como una herramienta eficaz y factible en la prevención y erradicación de la bacteria.⁵⁶

Además, la administración de vacunas no requiere de personal médico calificado, es menos costosa que la terapia antimicrobiana y podrían ser utilizadas tanto en el control de endemias o epidemias de cólera. Asimismo, resultarían más económicas para los países en desarrollo donde las infraestructuras sanitarias, hidráulicas y los sistemas de tratamientos de residuos son muy deficientes.^{19,23}

DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA EL CÓLERA

Desde el descubrimiento de *Vibrio cholerae* se ha trabajado en la producción de una vacuna contra esta enfermedad. En 1980, se comenzaron a realizar las primeras evaluaciones experimentales en vacunas parenterales contra *V. cholerae* O1.⁴ Sin embargo, se constató su limitada protección, corta duración (3 a 6 meses) y marcada reactogenicidad en regiones con cólera endémico, donde se habían realizado los estudios experimentales.⁴ No obstante, actualmente se conoce que para obtener una inmunidad adecuada contra *V. cholerae* es necesario estimular la respuesta local a nivel intestinal, lo que ha conducido al desarrollo, fundamentalmente, de vacunas orales contra el cólera (VOC).^{3,19}

Desde los años 80 de la pasada centuria hasta nuestros días, se han desarrollado VOC de células muertas y vivas atenuadas, sobre la base de los últimos avances en el conocimiento de la fisiología del sistema inmunológico intestinal y nuevos progresos en el campo de la ingeniería genética.⁴

A finales de 2002, la OMS sugirió el posible papel que desempeñarían las vacunas orales para la prevención y el control del cólera en las zonas endémicas y durante los brotes de esta enfermedad.

En este sentido, se propuso su uso potencial como una nueva e importante herramienta para la salud pública en países en desarrollo y para ser empleadas en situaciones de emergencia ante cualquier evento climatológico, desastre natural, zona de conflicto armado o campamentos de refugiados o desplazados.^{23,57-60}

En la actualidad, existen tres VOC licenciadas o reconocidas por la OMS, las cuales son más conocidas por sus nombres comerciales: DUKORAL[®], OROCHOL[®] y SHANCHOL[®].⁹ También existen otras VOC en estudio y candidatos vacunales contra el cólera (CVC) (Tabla.1)

Desde la aparición del cólera en el continente americano durante una epidemia en Perú (1991) y la posible amenaza de su introducción en Cuba, se ha estado realizando una investigación en el desarrollo de un CVC. Así, después de una serie de investigaciones se obtuvo el candidato vacunal 638 (CV 638).^{61,62}

Tabla.1. Vacunas orales contra *Vibrio Cholerae*^{1,9,10,33,55,61,65,67,68}

Características	WC-rBS	WC-solo	WC-sola modificada	CVD 103-HgR	Perú 15	CV 638
Nombre comercial	Dukoral	ORC-Vax	Shancol o mORCVAX	Orochol o Mutachol	CholeraGarde	–
Viva o muerta	Muerta	Muerta	Muerta	Muerta	Viva	Viva
Diana	O1 clásica biotipo El Tor más subunidad de la toxina B	O1 clásica El Tor; posible O139 (no datos de evaluación clínica)	O1 clásica El Tor; posible O139 (no datos de evaluación clínica)	O1 clásica El Tor	O1 clásica El TorInaba	O1 clásica El TorOgawa
Dosificación	Dos dosis entre 7–42 días (3 dosis para niños entre 2-5 años)	Dos dosis conal menos 14días de diferencia	Dos dosis con14 días de intervalo	Una dosis	Una dosis	Una dosis
Dosis evaluada en humanos	2,5 x 10 ¹⁰ células de las cepas: El TorInaba (Phil 6973), clásica Inaba (Cairo 48) y clásica Ogawa (Cairo 50)	5 x 10 ¹⁰ células de las cepas: El TorInaba (Phil 6973), clásica Ogawa (Cairo 50), clásica Inaba (569B) y O139 (4260B)	El TorInaba (Phil 6973): 600 UE-LPS Clásica Ogawa (Cairo 50): 300 UE-LPS Clásica Inaba (Cairo 48): 300 UE-LPS O139 (4260B): 600 UE-LPS	5 x 10 ⁸ UFC para áreas no endémicas 5 x 10 ⁹ UFC para áreas no endémicas	10 ⁷ –10 ⁹ UFC	10 ⁹ UFC
Duración de la protección	2 años (6 meses para niños entre 2–5 años)	≥3 años	≥3 años	seis meses (Solo estable en voluntarios norteamericanos)	–	No se han realizado estudios
Reactivación	Cada 2 años (cada 6 meses para niños entre 2–5 años)	Cada 2 años	Cada 3 años aunque se puede extender después de un ensayo clínico en Kolkata	Se desconoce	–	–
Intervalo de edad para vacunación	≥ 2 años	≥ 1 años	Shancol ≥1 año; mORCVAX ≥2 años	≥ 2 años	–	–
Requerimiento de búfer oral	Sí	No	No	Si	Si	Si
Temperatura de almacenamiento	2 a 8 °C	2–8 °C	2 a 8 °C	2 a 8 °C	–20 °C	2 a 8 °C
Caducidad	3 años	2 años	2 años	2 años	–	–
Reconocimiento internacional	Precalificada por OMS	No precalificada por OMS	Pendiente de precalificación de la OMS	No precalificada por la OMS	–	No
Precio para el sector público por dosis	~\$5,25	\$0,75	Shancol: \$1,85 o menos dependiendo del volumen mORC-Vax:~ \$0,75	No está disponible actualmente	–	–

*UE-LPS. Unidades de endotoxina de lipopolisacáridos. UFC. Unidades formadoras de colonias. Búfer. Disolución estabilizadora.

El CV 638 se produjo a partir de la cepa atenuada 638, la cual se obtuvo de una segunda generación de la cepa la C7258 *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa, que fue aislada durante la epidemia en Perú (1991).⁶³ Esta cepa fue modificada mediante técnicas de ingeniería genética, utilizando vectores suicidas y técnicas de intercambio alélico. Concretamente, el candidato vacunal 638 se obtuvo mediante supresión del profago CTXφ y el subsiguiente remplazo del gen *hapA*, que codifica la principal proteasa soluble de *V. cholerae* (HAP), por un alelo inactivado, mediante inserción del gen de la endoglucanasa A de *Clostridium thermocellum*. Esta última modificación se realizó como marca genética para realizar un test fenotípico sencillo que permita reportar la cepa.^{10,61,63,64}

Se determinó que la cepa 638 era la más adecuada para ser evaluada en ensayos clínicos (EC) al demostrarse su atenuación en diferentes modelos animales, por lo que fue utilizada como ingrediente activo en diversos ensayos clínicos en Cuba, Ecuador y Mozambique. La administración oral de una única dosis ha sido bien tolerada e inmunogénica, sin constatare eventos adversos graves.^{55,61-63,65,66} Además, se realizó un EC de reto en voluntarios adultos sanos en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) de La Habana, Cuba, donde se confirmó no solo la seguridad e inmunogenicidad de dicho candidato, sino que en un grupo de voluntarios, resultó protectora contra el cólera producido por una cepa El Tor.^{61,65,66}

Este CVC, cumple varias recomendaciones sugeridas por la OMS, como: vacuna viva atenuada, dosis única que confiere protección e inmunogenicidad y está compuesta por la cepa O1 clásica El Tor Ogawa, que en la actualidad es la principal causante de los brotes epidémicos de cólera a nivel mundial. Además, posee el biotipo y serotipo de las cepas aisladas durante los dos brotes reportados en Cuba.^{19,23,47,49,55}

La ocurrencia de los dos brotes de cólera notificados en Cuba (2012 y 2013) después de más un siglo sin su presencia en la Isla, crea el escenario idóneo para extender los estudios clínicos del CV 638, no solo a otros grupos de edades de individuos aparentemente sanos, sino a grupos más vulnerables como adultos con enfermedades crónicas no transmisibles, así como para realizar estudios de ensayos clínicos de fase II y III en diversas regiones de la Isla.

CONCLUSIONES

Después de analizar el contexto epidemiológico del cólera, es posible concluir que es una enfermedad reemergente, que se ha extendido a otras latitudes del planeta, donde no se reportaban casos o brotes epidémicos hace más de una centuria. A esto, se suma la convergencia de otros factores determinantes, como los fenómenos y desastres ambientales, la resistencia antimicrobiana, los servicios sanitarios inadecuados y la falta de vigilancia epidemiológica en países en desarrollo. Todo lo anterior, ha dado lugar a la recomendación del uso de vacunas como herramientas más eficaces para su prevención y control. En Cuba, a pesar de disponer de un sistema de vigilancia epidemiológica adecuado, se han presentado dos brotes de cólera hasta la fecha. Por tal razón, se considera que es el escenario idóneo para utilizar el candidato vacunal CV 638, en otras fases de su evaluación clínica, después de haber sido observada su seguridad, protección e inmunogenicidad en estudios anteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yuki Y, Kiyono H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. Expert review of vaccines. 2009;8(8):1083-97. Epub 2009/07/25.
2. Addressing emerging infectious disease threats: a prevention strategy for the United States. Executive summary. MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control. 1994;43(RR-5):1-18. Epub 1994/04/15.
3. Garcia HM, Valera RF, Menéndez JdJ. Nuevos enfoques sobre la aplicación de vacunas orales contra el cólera. Vaccimonitor[online]. 2010;19(2):24-9.

4. Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM. Cholera. Clinical microbiology reviews. 1995;8(1):48-86. Epub 1995/01/01.
5. de Magny GC, Mozumder PK, Grim CJ, Hasan NA, Naser MN, Alam M, *et al.* Role of zooplankton diversity in *Vibrio cholerae* population dynamics and in the incidence of cholera in the Bangladesh Sundarbans. Applied and environmental microbiology. 2011;77(17):6125-32. Epub 2011/07/19.
6. Chiavelli DA, Marsh JW, Taylor RK. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. Applied and environmental microbiology. 2001;67(7):3220-5. Epub 2001/06/27.
7. Vicente AC. On the emergence of atypical *Vibrio cholerae* O1 El Tor & cholera epidemic. The Indian journal of medical research. 2011;133:366-7. Epub 2011/05/04.
8. Ledon T, Campos J, Suzarte E, Marrero K, Rodríguez BL, Moreno A, *et al.* *Vibrio cholerae* O139: Surgimiento, evolución y estructura genética de CTXΦ. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007;38(1).
9. Pastor M, Pedraz JL, Esquisabel A. The state-of-the-art of approved and under-development cholera vaccines. Vaccine. 2013;31(38):4069-78. Epub 2013/07/13.
10. Ryan ET, Calderwood SB, Qadri F. Live attenuated oral cholera vaccines. Expert review of vaccines. 2006;5(4):483-94. Epub 2006/09/23.
11. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 1998;62(4):1301-14. Epub 1998/12/05.
12. Nelson EJ, Nelson DS, Salam MA, Sack DA. Antibiotics for both moderate and severe cholera. The New England journal of medicine. 2011;364(1):5-7. Epub 2010/12/15.
13. Hays J. Epidemics and Pandemics: Their Impacts on Human History. 1 ed: ABC-CLIO; 2005 513 p.
14. Chan CH, Tuite AR, Fisman DN. Historical epidemiology of the second cholera pandemic: relevance to present day disease dynamics. PloS one. 2013;8(8):e72498. Epub 2013/08/31.
15. An old enemy returns. Bulletin of the World Health Organization. 2009;87(2):85-6. Epub 2009/03/11.
16. Nusrin S, Gil AI, Bhuiyan NA, Safa A, Asakura M, Lanata CF, *et al.* Peruvian *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains possess a distinct region in the *Vibrio* seventh pandemic island-II that differentiates them from the prototype seventh pandemic El Tor strains. Journal of medical microbiology. 2009;58(Pt 3):342-54. Epub 2009/02/12.
17. Pérez Ortiz L, Madrigal Lomba R. El cólera en Cuba. Apuntes históricos. Rev Méd Electrón 2010;32(6 Supl 1).
18. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. Lancet. 2012;379(9835):2466-76. Epub 2012/07/04.
19. Clemens JD. Vaccines in the time of cholera. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(21):8529-30. Epub 2011/05/13.
20. Islam MS, Drasar BS, Sack RB. Probable role of blue-green algae in maintaining endemicity and seasonality of cholera in Bangladesh: a hypothesis. Journal of diarrhoeal diseases research. 1994;12(4):245-56. Epub 1994/12/01.
21. 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. Epub 2005/08/09.
22. Schwartz BS, Harris JB, Khan AI, Larocque RC, Sack DA, Malek MA, *et al.* Diarrheal epidemics in Dhaka, Bangladesh, during three consecutive floods: 1988, 1998, and 2004. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2006;74(6):1067-73. Epub 2006/06/09.

23. Clemens J, Shin S, Sur D, Nair GB, Holmgren J. New-generation vaccines against cholera. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011;8(12):701-10. Epub 2011/11/09.
24. Harris JB, Larocque RC, Charles RC, Mazumder RN, Khan AI, Bardhan PK. Cholera's western front. *Lancet*. 2010;376(9757):1961-5. Epub 2010/11/30.
25. Akanda AS, Jutla AS, Gute DM, Evans T, Islam S. Reinforcing cholera intervention through prediction-aided prevention. *Bulletin of the World Health Organization*. 2012;90(3):243-4. Epub 2012/03/31.
26. Kakar F, Ahmadzai AH, Habib N, Taqdeer A, Hartman AF. A successful response to an outbreak of cholera in Afghanistan. *Tropical doctor*. 2008;38(1):17-20. Epub 2008/02/28.
27. Chowdhury MI, Sheikh A, Qadri F. Development of Peru-15 (CholeraGarde), a live-attenuated oral cholera vaccine: 1991-2009. *Expert review of vaccines*. 2009;8(12):1643-52. Epub 2009/12/01.
28. Khazaei HA, Rezaei N, Bagheri GR, Moin AA. A six-year study on *Vibrio cholerae* in southeastern Iran. *Japanese journal of infectious diseases*. 2005;58(1):8-10. Epub 2005/02/25.
29. Richie EE, Punjabi NH, Sidharta YY, Peetosutan KK, Sukandar MM, Wasserman SS, 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(22):2399-410. Epub 2000/03/30.
30. Anh DD, Lopez AL, Thiem VD, Grahek SL, Duong TN, Park JK, et al. Use of oral cholera vaccines in an outbreak in Vietnam: a case control study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(1):e1006. Epub 2011/02/02.
31. Sinha A, Sengupta S, Ghosh S, Basu S, Sur D, Kanungo S, et al. Evaluation of a rapid dipstick test for identifying cholera cases during the outbreak. *The Indian journal of medical research*. 2012;135(4):523-8. Epub 2012/06/06.
32. Kanungo S, Sah BK, Lopez AL, Sung JS, Paisley AM, Sur D, et al. Cholera in India: an analysis of reports, 1997-2006. *Bulletin of the World Health Organization*. 2010;88(3):185-91. Epub 2010/04/30.
33. Alam MM, Riyadh MA, Fatema K, Rahman MA, Akhtar N, Ahmed T, et al. Antigen-specific memory B-cell responses in Bangladeshi adults after one- or two-dose oral killed cholera vaccination and comparison with responses in patients with naturally acquired cholera. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2011;18(5):844-50. Epub 2011/02/25.
34. Chowdhury F, Khan AI, Harris JB, LaRocque RC, Chowdhury MI, Ryan ET, et al. A comparison of clinical and immunologic features in children and older patients hospitalized with severe cholera in Bangladesh. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008;27(11):986-92. Epub 2008/10/04.
35. Shanan S, Abd H, Hedenstrom I, Saeed A, Sandstrom G. Detection of *Vibrio cholerae* and *Acanthamoeba* species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan. *BMC research notes*. 2011;4:109. Epub 2011/04/08.
36. Lucas ME, Deen JL, von Seidlein L, Wang XY, Ampuero J, Puri M, et al. Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *The New England journal of medicine*. 2005;352(8):757-67. Epub 2005/02/25.
37. Ciglenecki I, Sakoba K, Luquero FJ, Heile M, Itama C, Mengel M, et al. Feasibility of mass vaccination campaign with oral cholera vaccines in response to an outbreak in Guinea. *PLoS medicine*. 2013;10(9):e1001512. Epub 2013/09/24.
38. Schaetti C, Sundaram N, Merten S, Ali SM, Nyambedha EO, Lapika B, et al. Comparing sociocultural features of cholera in three endemic African settings. *BMC medicine*. 2013;11:206. Epub 2013/09/21.
39. Dorlencourt F, Legros D, Paquet C, Neira M, Ivanoff B, Le Saout E. Effectiveness of mass vaccination with WC/rBS cholera vaccine during an epidemic in Adjumani district,

- Uganda. Bulletin of the World Health Organization. 1999;77(11):949-50. Epub 1999/12/29.
40. Chelimilla H, Widjaja D, Carvajal S, Kumbum K. Life-threatening manifestation of diarrhea. Case reports in infectious diseases. 2013;2013:354697. Epub 2013/04/23.
 41. Marquetti Fernandez Mdel C, Fuster Callaba CA, Estevez Torres G, Somarriba Lopez L. Contributions made by the Cuban advisory work to the entomological surveillance in Haiti. Revista cubana de medicina tropical. 2011;63(2):177-80. Epub 2011/05/01. Aportes de la asesoria cubana a la vigilancia entomologica en Haiti.
 42. Hendriksen RS, Price LB, Schupp JM, Gillece JD, Kaas RS, Engelthaler DM, et al. Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. mBio. 2011;2(4):e00157-11. Epub 2011/08/25.
 43. Frerichs RR, Keim PS, Barraïs R, Piarroux R. Nepalese origin of cholera epidemic in Haiti. Clin Microbiol Infect. 2012;18:E158-E63.
 44. Update: outbreak of cholera ---Haiti, 2010. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2010;59(48):1586-90. Epub 2010/12/15.
 45. Gelting R, Bliss K, Patrick M, Lockhart G, Handzel T. Water, sanitation and hygiene in haiti: past, present, and future. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2013;89(4):665-70. Epub 2013/10/10.
 46. Guasch Fernández RS. Medidas sanitarias para la prevención del cólera en la frontera del Aeropuerto Internacional "Antonio Maceo" de Santiago de Cuba. MEDISAN [online] 2012, vol16, n2, pp 290-294 ISSN 1029-3019.
 47. Estrada Paneque MU, Estrada Vinajera G, Vinajera Torres C. Cólera. Contexto clínico-epidemiológico y social. A propósito del brote epidémico en Granma, Cuba. Multimed [online] 2012, 16 (4) Octubre-Diciembre ISSN 1028-4818.
 48. Gallardo Y, Gallardo R. Prevention and promotion is the cornerstone in the effort to eradicate cholera in primary care. Medwave 2013;13(9):e5819 doi: 105867/medwave2013095819.
 49. Pan American Health Organization (PAHO). Epidemiological update. Cholera. 23 August 2013. Washington, DC; PAHO; 2013. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19788&Itemid=.
 50. Ciglenecki I, Bichet M, Tena J, Mondesir E, Bastard M, Tran NT, et al. Cholera in pregnancy: outcomes from a specialized cholera treatment unit for pregnant women in Leogane, Haiti. PLoS neglected tropical diseases. 2013;7(8):e2368. Epub 2013/08/24.
 51. Tuynman W BA, Croisier A, Fesselet J, Herp M, et al (2004) Rehydration therapy and monitoring. In: Cholera Guideline. Paris, Médecins Sans Frontières. pp 47-49.
 52. Zeriouh H, Romero D, Garcia-Gutierrez L, Cazorla FM, de Vicente A, Perez-Garcia A. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. Mol Plant Microbe Interact. 2011;24(12):1540-52. Epub 2011/11/10.
 53. Das JK, Ali A, Salam RA, Bhutta ZA. Antibiotics for the treatment of Cholera, Shigella and Cryptosporidium in children. BMC public health. 2013;13(Suppl 3):S10.
 54. Tran HD, Alam M, Trung NV, Kinh NV, Nguyen HH, Pham VC, et al. Multi-drug resistant *Vibrio cholerae* O1 variant El Tor isolated in northern Vietnam between 2007 and 2010. Journal of medical microbiology. 2012;61(Pt 3):431-7. Epub 2011/10/22.
 55. Shin S, Desai SN, Sah BK, Clemens JD. Oral vaccines against cholera. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2011;52(11):1343-9. Epub 2011/04/19.

56. Cholera, 2003. Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations. 2004;79(31):281-8. Epub 2004/08/19.
57. Verma R, Khanna P, Chawla S. Cholera vaccine: new preventive tool for endemic countries. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2012;8(5):682-4. Epub 2012/05/29.
58. Date KA, Vicari A, Hyde TB, Mintz E, Danovaro-Holliday MC, Henry A, et al. Considerations for oral cholera vaccine use during outbreak after earthquake in Haiti, 2010-2011. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(11):2105-12. Epub 2011/11/22.
59. Naficy A, Rao MR, Paquet C, Antona D, Sorkin A, Clemens JD. Treatment and vaccination strategies to control cholera in sub-Saharan refugee settings: a cost-effectiveness analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1998;279(7):521-5. Epub 1998/02/28.
60. Legros D, Paquet C, Perea W, Marty I, Mugisha NK, Royer H, et al. Mass vaccination with a two-dose oral cholera vaccine in a refugee camp. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999;77(10):837-42. Epub 1999/12/11.
61. Garcia L, Jidy MD, Garcia H, Rodriguez BL, Fernandez R, Ano G, et al. The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. *Infection and immunity*. 2005;73(5):3018-24. Epub 2005/04/23.
62. García HM, Thompson R, Valera R, Fando R, Fumane J, Jani I, et al. A single dose of live-attenuated 638 *Vibrio cholerae* oral vaccine is safe and immunogenic in adult volunteers in Mozambique. *VacciMonitor*. 2011;20(3):1-8.
63. Benitez JA, Silva AJ, Rodriguez BL, Fando R, Campos J, Robert A, et al. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Archives of medical research*. 1996;27(3):275-83. Epub 1996/01/01.
64. Robert A, Silva A, Benitez JA, Rodriguez BL, Fando R, Campos J, et al. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. *Vaccine*. 1996;14(16):1517-22. Epub 1996/11/01.
65. Valera R, Garcia HM, Jidy MD, Mirabal M, Armesto MI, Fando R, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine 638 in Cuban adults. *Vaccine*. 2009;27(47):6564-9. Epub 2009/09/02.
66. Diaz Jidy M, Perez Rodriguez A, Fernandez Llanes R, Bravo Farinas L, Garcia Sanchez H, Valera Fernandez R, et al. Challenge clinical trial for evaluation of a vaccine candidate strain against cholera. *Revista cubana de medicina tropical*. 2010;62(3):194-9. Epub 2010/09/01. Ensayo clinico de reto, para evaluar una cepa candidata a vacuna contra el colera.
67. Olsson L, Parment PA. Present and future cholera vaccines. *Expert review of vaccines*. 2006;5(6):751-2. Epub 2006/12/23.
68. Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hoepfer A, et al. Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of a single dose of Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infection and immunity*. 2002;70(4):1965-70. Epub 2002/03/16.