

VISIÓN ACTUAL DEL CÓLERA

AN ACTUAL REVIEW ABOUT CHOLERA DISEASE

M.^a. Eiros¹, Académico de Número; F.J. Luquero², E. Ferreras³,
P. López Encinar⁴, Académico Corresponsal; A. Orduña⁵, Académico de
Número Electo; A. Rodríguez Torres⁶, Académico de Número

¹*Servicio y Área de Microbiología, Hospital Universitario “Río Hortega” y Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.*

²*Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore.*

³*Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud “Carlos III”. Madrid.*

⁴*Profesor Titular Jubilado; Área de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario. Valladolid.*

⁵*Servicio y Área de Microbiología, Hospital Clínico Universitario y Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid Centro de Salud Pilarica-Circular, Valladolid.*

⁶*Catedrático Emérito y Ex Director de Departamento. Servicio y Área de Microbiología, Hospital Clínico Universitario y Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.*

Correspondencia J.M.^a.Eiros Bouza. Microbiología. Sexta Planta. Facultad de Medicina. Avda. Ramón y Cajal 7. 47002 Valladolid
Tlfno.: 983 423063. Fax 983 423022. eiros@med.uva.es

Sesión Presentada el 8 de febrero de 2018.

An Real Acad Med Cir Vall 2018; 55: 33-42

RESUMEN

El cólera de manifiesta con síntomas diarreicos y deshidratación causada por el *Vibrio cholerae* con los serotipos: O1 y O139. En su forma más grave puede producir una intensa deshidratación y shock hipovolémico causando la muerte.

Aunque es originario del río Ganges, la última pandemia surgió en Indonesia y se ha propagado por Asia, África y América.

Aun desconociéndose con precisión el número anual de casos, se estima en tres millones con una mortalidad de 100.000 personas.

La vacunación y las medidas concretas como la potabilización del agua en sitios puntuales han surtido su efecto, pero para la solución a largo plazo, se necesitaría

provisiones permanentes de agua potabilizada y saneamiento; mejora del sistema de salud y reducción general de la pobreza.

Palabras clave: *Vibrio Cholerae*, deshidratación, shock hipovolémico, pandemia, vacunas y agua potable.

ABSTRACT

Cholera disease shows diarrhoea symptoms and dehydration caused by *Vibrio Cholerae*, which Serotype are: O₁ and O₁₃₉.

Although, it's from Ganges River, the last pandemic arose in Indonesia and it has been spreaded in Asia, Africa and America.

It's calculated three millions of Clinical cases with 100.000 dead people, but the number of the cases hasn't yet known.

Vaccination and concrete measures as: water purification in determinated places, have been partially succeeded but it should be needed permanente provisions of healthy drinking water, improvising health system and general reduction of poverty.

Key words: *Vibrio Cholerae*; Dehydration; Hypovolemic Shock; Pandemic; Vaccine and Drinking water.

ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por *Vibrio cholerae* serogrupos O1 y O139, que en su forma más grave puede producir intensa deshidratación y shock hipovolémico causando la muerte en pocas horas^(1,2). *V. cholerae* se visualizan como bacilos gramnegativos, curvos, muy móviles. En su hábitat natural pueblan el agua salada de costas y estuarios salobres en simbiosis con algas y pequeños crustáceos. Se distinguen más de 200 serogrupos según los carbohidratos de los antígenos O de los lipopolisacáridos^(3,4)

El genoma de *Vibrio cholerae* contiene 3885 marcos de lectura abiertos distribuidos en dos cromosomas circulares, el cromosoma 1 (2.96 millones de pares de bases) y el cromosoma 2 (1.07 millones de pares de bases). El primer cromosoma contiene genes para funciones celulares esenciales como la replicación del ADN, la transcripción y la síntesis de proteínas, además de contener la mayoría de los genes de virulencia como el gen de la toxina del cólera que está localizado en el fago CTXphi integrado en este cromosoma. El segundo cromosoma también contiene genes esenciales como genes de proteínas ribosomales y genes de transporte^(5,6).

El cólera epidémico hasta 1992 estuvo causado exclusivamente por el serogrupo O1 y desde entonces también por el serogrupo O139⁽⁷⁾. Existen dos biotipos de *V. cholerae* serogrupo O1: Clásico y El Tor. Desde 1817 se han producido 7 pandemias de cólera, las 6 primeras han sido causadas por el biotipo clásico y la última por El Tor. Aunque el cólera es originario del río Ganges, la última pandemia surgió en Indonesia y se ha propagado por Asia, África y América. En África ha ocasionado epidemias graves, asociadas a guerras y graves problemas humanitarios como se asistieron en Sudán del Sur y Uganda, antes de convertirse en una pandemia que es responsable en la actualidad del 90% de los casos de cólera comunicados a la OMS^(8,9). Si bien se desconoce con precisión el número anual de casos se estima en 3 millones y su mortalidad de 100.000 personas.

Se acepta como “Brote” la aparición de un número observado de casos superior a los esperados en un área en un período de tiempo determinado. En este sentido en ausencia de cólera, un caso constituye un brote tal y como ha acontecido en Angola (2006), Zimbabwe (2008-9), Haití (2010), Yemen (2017).

Se alude al Cólera “Endémico” ante la aparición de diarrea colérica confirmada por cultivo/identificación fecal en una población en al menos tres de los últimos cinco años, tal y como sucede en India, Bangladesh y la República Democrática del Congo (10-12)

La infección se adquiere por la ingestión de agua o alimentos contaminados y con menor frecuencia por contacto de persona a persona, ya que se requiere un inóculo grande para producir la infección. La hipoclorhidria inducida por *Helicobacter pylori* y el grupo sanguíneo O son factores del hospedador favorecedores de la infección.

MECANISMOS PATOGENICOS, CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

El cólera se debe a la acción de una enterotoxina que ocasiona la secreción de agua y electrolitos, en concentraciones similares a las del plasma, en la luz del intestino delgado. La toxina posee dos subunidades: la subunidad B que une la toxina a un receptor (gangliósido GM1) sobre las células mucosas intestinales; y la subunidad A, con dos componentes: el A1 y el A2. El A1 es el componente activo que mediante el aumento del AMP cíclico de las células epiteliales bloquea la absorción de Na⁺ y Cl⁻ y aumenta la secreción de Cl⁻ y agua de las células en las criptas. Existen otros factores de virulencia, entre los que destaca la fimbria corregulada por toxina que es esencial para que se produzca la colonización del intestino delgado. Los factores de virulencia están regulados por una proteína reguladora (ToxR) que se producen en respuesta al entorno⁽¹³⁻¹⁷⁾.

Las manifestaciones clínicas son muy variables, desde la infección asintomática hasta los casos de “*cholera gravis*” letales en pocas horas sin tratamiento⁽¹⁸⁾. El periodo de incubación es de 24 a 48 horas. La diarrea es acuosa, comienza

de forma brusca, sin dolor abdominal y suele acompañarse de vómitos y calambres, pero no de fiebre. Las heces son líquidas, de aspecto grisáceo con moco (en “agua de arroz”). La gravedad está en función de la pérdida de agua y electrolitos y la deshidratación resultante. La exploración física pone de manifiesto signos de deshidratación (hipotensión postural, disminución de la turgencia cutánea, taquicardia, oliguria, hundimiento de los globos oculares...) ⁽¹⁹⁾ y en los análisis de sangre puede haber hemoconcentración, leucocitosis, aumento de la urea y de la creatinina, acidosis metabólica con disminución de bicarbonato y aumento del hiato aniónico, con concentraciones de Na, K y Cl normales. En los casos más graves sin tratamiento el paciente entra en coma y shock y se puede producir el fallecimiento en muy poco tiempo ⁽²⁰⁾.

Ante la sospecha clínica parece pertinente advertir al laboratorio. Mediante microscopía de campo oscuro el microbiólogo experto puede identificar la bacteria en fresco en heces recién emitidas y se pueden utilizar anticuerpos específicos que bloquean el movimiento de los vibrios y que permite identificar el serotipo. Se utilizan medios de cultivo específicos (TTG o TCBS) ⁽²¹⁻²³⁾. Están disponibles métodos de diagnóstico molecular basados en la amplificación genómica que emplean la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa que ofertan resultados altamente específicos en poco tiempo ^(24,25).

La principal medida terapéutica es la rehidratación rápida de las pérdidas. En los casos con deshidratación leve o moderada (5-10% del peso corporal) se utiliza la vía oral, ya que el mecanismo de absorción de Na⁺ unido a glucosa (o sacarosa) se conserva intacto en la mucosa aún bajo los efectos de la toxina del cólera. La rehidratación oral se puede hacer añadiendo a agua limpia el contenido de bolsas que contienen sales y azúcar con baja osmolaridad (la solución de la OMS contiene: Na⁺ 75 mmol/L, K⁺ 20 mmol/L, Cl⁻ 65 mmol/L, citrato 10 mmol/L, glucosa 75 mmol/L; con una osmolaridad de 245). La rehidratación puede hacerse con soluciones a base de arroz o añadiendo a 1 litro de agua limpia media cucharadita de café de sal de mesa y 4 cucharadas de azúcar, y tomar frutas (plátano o agua de coco verde) como fuente de potasio. En los casos de deshidratación profunda (>10% peso corporal) en los que los pacientes no pueden ingerir líquidos se utilizan fluidos intravenosos (solución de Ringer lactato) con suplementos de potasio por vía oral. Se recomienda reponer 1/4 de las pérdidas en una hora, y otro cuarto en 3 a 6 horas, pasando a la vía oral cuando sea posible. Los antibióticos no son esenciales, aunque se recomiendan en los casos graves.

PREVENCIÓN Y COORDINACIÓN

El cólera se reduciría notablemente si se mejorará las condiciones de agua potable y adecuado tratamiento de las excretas en países en desarrollo. La vacuna parenteral contra el cólera es poco eficaz y ya no se recomienda. En la

actualidad se dispone de dos vacunas orales elaboradas con bacilos muertos que brindan una protección del 60 al 80%: a) WC-Rbs (Dukoral) es una vacuna de células enteras muertas de varios biotipos de *V. cholerae* O1 junto a subunidad B de la toxina del cólera; b) Vacuna de células enteras muertas de varios biotipos y serotipos de *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* O139, sin subunidad B de toxina colérica (Sanchol). Estas vacunas se utilizan internacionalmente en áreas endémicas y en zonas con alto riesgo de epidemia ^(26, 27).

En la experiencia de algunos de nosotros la medida primordial ante la aparición de un “Brote” es articular la coordinación entre los “proveedores” de salud. Ello es debido alta letalidad en los Brotes, la evolución rápida de la presentación clínica de los casos graves hacia la deshidratación, el shock y la muerte y el acceso deficiente a la atención médica en entornos de recursos precarios. Existen excelentes aproximaciones que delimitan la interconexión de factores ambientales y de infraestructura sanitaria asociados a las epidemias ⁽²⁸⁾.

En nuestro criterio las prioridades sanitarias en esta situación se enumeran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Diferentes prioridades sanitarias ante una epidemia de Cólera

Reducir su propagación
Acceso a agua controlada
Saneamiento
Movilización comunitaria: promoción de higiene
Prácticas funerarias seguras
Aislamiento y control de infección en estructuras sanitarias

En ellas cabe implicar a múltiples “actores” entre los que se incluyen: diferentes ministerios, la ONU y sus Agencias (en coliderazgo de la OMS), Organizaciones no gubernamentales, Comunidades locales, así como en cada país una Fuerza Nacional para el Control y Centro de Mando.

VACUNACIÓN. ALGUNAS EXPERIENCIAS

Nuestro grupo ha podido integrarse en algunas experiencias de éxito en el ámbito del empleo de una dosis oral de vacuna como respuesta a un brote. Es conocido que en la República de Guinea se habían documentado grandes epidemias regulares entre 2003 y 2008 con alta mortalidad. Si bien no se notificaron casos de 2009 a 2012. Con mucha frecuencia, las tasas de ataque más altas se declaraban en los distritos marítimos y, por lo general, las epidemias comienzan en Forecariah / Boffa, dos prefecturas costeras.

El cólera muestra un fuerte patrón estacional en Guinea, con el pico de casos coincidiendo con la temporada de lluvias (comienza en junio /julio). En 2012, los casos comenzaron bastante antes de la temporada habitual de cólera.

Una gran epidemia estaba en curso en Sierra Leona con más de 2.000 casos declarados en marzo de 2012. La entidad “Médicos Sin Fronteras” (MSF) decidió poner en marcha el paquete estándar de control del cólera que incluía la gestión de casos, agua y saneamiento y se implementó una campaña de vacunación con el objetivo de controlar la epidemia en las dos áreas afectadas.

El principal objetivo de este estudio fue para estimar la efectividad a corto plazo de dos dosis de Shanchol usadas como parte de la respuesta integrada a un brote de cólera en África ⁽²⁹⁾. Como población “Diana” se incluyeron todas las personas > 12 meses presentes en los lugares de vacunación (Boffa: 163.086 habitantes; y Forécariah: 46.008 habitantes). De las 350.000 dosis solicitadas, 150.000 se recibieron con 15 días de retraso, si bien no se presentaron dificultades de importación. El volumen del envío representó $12 \text{ m}^3 + 5 \text{ m}^3$, en el que se estableció una cadena de frío con camiones refrigerados mediante contenedores frigoríficos. La información se difundió a través de las autoridades una semana antes y en las Comunidades dos días antes del día de la vacunación a través de intermediarios del tipo de “*crieur public*” y “*chefs de villages*”. En el ámbito de la educación sanitaria se elaboraron gran cantidad de mensajes y se complementaron con otras herramientas preventivas para la vacunación como la distribución de jabón (“*savon sureau*”). En Boffa se dispusieron 31 equipos de 9 miembros con tres bases y en Forecariah 12 equipos de 5 miembros con una base. De las 350,000 dosis solicitadas fueron 316,250 las dosis de Shanchol administradas. El promedio de personas vacunadas por equipo y día se situó en 728 (con un rango entre 102 y 1830), siendo el coste por dosis administrada de 2,4 € (1,55 € por vacuna).

El estudio de casos y controles emparejado en Guinea se desarrolló entre el 20 de mayo y 19 de octubre de 2012. Los casos sospechosos de cólera fueron confirmados por medio de una prueba rápida y se seleccionaron los controles entre vecinos de la misma edad y sexo que los pacientes del caso. Se compararon las probabilidades de vacunación entre los pacientes de casos y los controles en modelos de regresión logística condicional bivariados y ajustados.

La Efectividad vacunal se calculó como $(1 - \text{odds ratio}) \times 100$. Entre el 8 de junio y el 19 de octubre de 2012, inscribimos a 40 pacientes y 160 controles en el estudio para el análisis primario. Después del ajuste por posibles confusiones la vacunación con dos dosis completas se asoció con protección frente al cólera (efectividad, 86.6%; intervalo de confianza del 95%, 56.7 a 95,8; $P = 0,001$). El análisis de casos confirmados por aislamiento mediante cultivo o por detección genómica por PCR mostró una efectividad del 91.6% (95CI%: 58.6-98.3). Reali-

zamos un ajuste por: número de personas que viven en el hogar, tratamiento del agua antes del consumo y compartir la letrina. A pesar del entorno (zonas rurales remotas con una población muy móvil) se consiguió una alta cobertura vacunal, con buena aceptabilidad. La cobertura fue menor en los adultos varones en ambos sitios, con diferencias principalmente en Forecariah (donde la distribución de jabón y cloro entre mujeres en edad fértil supusieron motivación extra) y se notificó un bajo número de efectos adversos.

En este estudio, Shanchol fue efectivo cuando se usó en respuesta a un brote de cólera en Guinea. Se proporciona evidencia que respalda la adición de la vacunación como parte de la respuesta a un brote. También apoya los esfuerzos en curso para establecer una reserva de vacuna contra el cólera para uso de emergencia, lo que mejoraría la prevención de brotes y estrategias de control.

Una segunda experiencia en la que hemos tenido el privilegio de participar fue la de estimar la efectividad a corto plazo de una dosis de Shanchol usado dentro de la respuesta integrada al brote de cólera en Lusaka (30). Esta ciudad de 3.210.703 de habitantes es la capital de Zambia, país con un censo poblacional de 13.046.508 personas, de las cuales un 68% viven por debajo del umbral de pobreza, con una tasa de crecimiento anual del 2,8% y cuya esperanza de vida al nacer se sitúa en 59 años. El 47% de la población resulta menor de 15 años y la densidad de población del país es de 16 hab/ km².

En este contexto el Ministerio de Salud de Zambia y MSF apostaron por utilizar una sola dosis de vacuna oral, ya que no se disponía de suficiente vacuna en la reserva global para proporcionar dos dosis a la población en riesgo. La estrategia era la de controlar la epidemia, en primera instancia y vacunar las áreas de alto riesgo de Lusaka para detener la transmisión dentro de la ciudad con ello se pretendía limitar la probabilidad de propagación dentro del país, y abrir la posibilidad de proporcionar una segunda dosis cuando se dispusiese de más dosis. El estudio de casos y controles apareados se realizó entre el 24 abril y el 27 de junio de 2016. La efectividad vacunal fue del 84%.

La solución a largo plazo para el control del cólera es la provisión de agua potable y saneamiento, la mejora del sistema de salud y la reducción general de la pobreza. La vacunación es una herramienta complementaria que puede usarse a medio plazo hasta que se implementen estrategias de prevención y control a largo plazo en áreas endémicas. La vacunación puede complementar la respuesta ante un brote estándar. La OMS ha revitalizado la Fuerza de Tarea Global para el Control del Cólera (GTFCC) para reforzar la coordinación mundial a fin de garantizar que se prioricen las necesidades de los países de alto riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fournier JM, Quilici ML. [Cholera]. *Presse Med.* 2007; 36(4 Pt 2):727-39.
2. Clemens JD, Nair GB, Ahmed T, Qadri F, Holmgren J. Cholera. *Lancet.* 2017; 390: 1539-49.
3. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. *Lancet.* 2004; 363: 223-33.
4. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. *Lancet.* 2012; 379: 2466-76.
5. Yi Y, Lu N, Liu F, Li J, Zhang R, Jia L, Jing H, Xia H, Yang Y, Zhu B, Hu Y, Cui Y. Genome sequence and comparative analysis of a *Vibrio cholerae* O139 strain E306 isolated from a cholera case in China. *Gut Pathog.* 2014; 6: 3. doi: 10.1186/1757-4749-6-3.
6. Hossain M, Alam M, Khaleque A, Islam S, Sadique A, Khan N, Halim Z, Sarker M, El-Sayed NM, Huq A, Ahsan GU, Colwell RR. Virulence-Related Genes Identified from the Genome Sequence of the Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* Strain VcN1, Isolated from Dhaka, Bangladesh. *Genome Announc.* 2018; 6. pii: e01513-17.
7. Faruque AS, Fuchs GJ, Albert MJ. Changing epidemiology of cholera due to *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in Dhaka, Bangladesh. *Epidemiol Infect.* 1996; 116: 275-8.
8. Nadri J, Sauvageot D, Njanpop-Lafourcade BM, Baltazar CS, Banla Kere A, Bwire G, Coulibaly D, Kacou N'Douba A, Kagirita A, Keita S, Koivogui L, Landoh DE, Langa JP, Miwanda BN, Mutombo Ndongala G, Mwakapeje ER, Mwambeta JL, Mengel MA, Gessner BD. Sensitivity, Specificity, and Public-Health Utility of Clinical Case Definitions Based on the Signs and Symptoms of Cholera in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 98: 1021-30.
9. Abubakar A, Bwire G, Azman AS, Bouhenia M, Deng LL, Wamala JF, Rumunu J, Kagirita A, Rauzier J, Grout L, Martin S, Orach CG, Luquero FJ, Quilici ML. Cholera Epidemic in South Sudan and Uganda and Need for International Collaboration in Cholera Control. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24: 883-7.
10. Pal BB, Nayak SR, Khuntia HK. Epidemiology and Antibiogram Profile of *Vibrio cholerae* Isolates between 2004-2013 from Odisha, India. *Jpn J Infect Dis.* 2018; 71: 99-103.
11. Muyembe JJ, Bompangue D, Mutombo G, Akilimali L, Mutombo A, Miwanda B, Mpuruta J de D, Deka KK, Bitakyerwa F, Saidi JM, Mutadi AL, Kakongo RS, Birembano F, Mengel M, Gessner BD, Ilunga BK. Elimination of cholera in the democratic Republic of the Congo: the new national policy. *J Infect Dis.* 2013; 208 Suppl 1:S86-91.
12. Munyuli MT, Kavuvu JM, Mulinganya G, Bwinja GM. The Potential Financial Costs of Climate Change on Health of Urban and Rural Citizens: A Case Study of *Vibrio cholerae* Infections at Bukavu Town, South Kivu Province, Eastern of Democratic Republic of Congo. *Iran J Public Health.* 2013; 42: 707-25.

13. Das B, Bischerour J, Barre FX. VGJphi integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 2516-21.
14. Zhang H, Pang B, Zhang L, Kan B. [Gene expression differences of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains in mannitol fermentation medium and Luria-Bertani broth]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2009; 49: 733-9.
15. Sloup RE, Konal AE, Severin GB, Korir ML, Bagdasarian MM, Bagdasarian M, Waters CM. Cyclic Di-GMP and VpsR Induce the Expression of Type II Secretion in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*. 2017; 199. pii: e00106-17.
16. Faruque SM, Nair GB. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Immunol*. 2002; 46: 59-66.
17. Faruque SM, Mekalanos JJ. Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends Microbiol*. 2003 ; 11: 505-10.
18. Nadri J, Sauvageot D, Njanpop-Lafourcade BM, Baltazar CS, Banla Kere A, Bwire G, Coulibaly D, Kacou N'Douba A, Kagirita A, Keita S, Koivogui L, Landoh DE, Langa JP, Miwanda BN, Mutombo Ndongala G, Mwakapeje ER, Mwambeta JL, Mengel MA, Gessner BD. Sensitivity, Specificity, and Public-Health Utility of Clinical Case Definitions Based on the Signs and Symptoms of Cholera in Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 98: 1021-30.
19. Somboonwit C, Menezes LJ, Holt DA, Sinnott JT, Shapshak P. Current views and challenges on clinical cholera. *Bioinformatics*. 2017; 13: 405-9.
20. Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. *Asian Pac J Trop Med*. 2011; 4: 573-80.
21. Seredin VG, Mukhamedov SM, Inzhevatova MV, Kocherovskaia Elu, Nizamova DT, Pisarenko NG. [Optimization of bacteriologic studies of cholera]. *Lab Delo*. 1990;8: 75-6.
22. Alam M, Hasan NA, Sultana M, Nair GB, Sadique A, Faruque AS, Endtz HP, Sack RB, Huq A, Colwell RR, Izumiya H, Morita M, Watanabe H, Cravioto A. Diagnostic limitations to accurate diagnosis of cholera. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 3918-22.
23. Sinha A, Sengupta S, Ghosh S, Basu S, Sur D, Kanungo S, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Nagamani K, Rao MN, Nandy RK. Evaluation of a rapid dipstick test for identifying cholera cases during the outbreak. *Indian J Med Res*. 2012; 135: 523-8.
24. Rivera IN, Lipp EK, Gil A, Choopun N, Huq A, Colwell RR. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environ Microbiol*. 2003; 5: 599-606.
25. Greig DR, Hickey TJ, Boxall MD, Begum H, Gentle A, Jenkins C, Chattaway MA. A real-time multiplex PCR for the identification and typing of *Vibrio cholerae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018; 90: 171-6.
26. Cholera vaccines: WHO position paper – August 2017. *Wkly Epidemiol Rec*. 2017; 92: 477-98.

27. Graves P, Deeks J, Demicheli V, Pratt M, Jefferson T. Vacunas para la prevención del cólera (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2008 Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2008 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
28. Jutla A, Whitcombe E, Hasan N, Haley B, Akanda A, Huq A, Alam M, Sack RB, Colwell R. Environmental factors influencing epidemic cholera. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 89: 597-607.
29. Luquero FJ, Grout L, Ciglenecki I, Sakoba K, Traore B, Heile M, Diallo AA, Itama C, Page AL, Quilici ML, Mengel MA, Eiros JM, Serafini M, Legros D, Grais RF. Use of *Vibrio cholerae* vaccine in an outbreak in Guinea. *N Engl J Med.* 2014; 370: 2111-20.
30. Ferreras E, Chizema-Kawesha E, Blake A, Chewe O, Mwaba J, Zulu G, Poncin M, Rakesh A, Page AL, Stoitsova S, Voute C, Uzzeni F, Robert H, Serafini M, Matapo B, Eiros JM, Quilici ML, Pezzoli L, Azman AS, Cohuet S, Ciglenecki I, Malama K, Luquero FJ. Single-Dose Cholera Vaccine in Response to an Outbreak in Zambia. *N Engl J Med.* 2018; 378: 577-9.