

Rassegna

Review

Attualità sul colera

Cholera: recent acquisitions

**Salvatore Nardiello, Adelaide Ilario, Francesco M. Fusco,
Gianluca Cuomo**

Dipartimento Assistenziale di Malattie Infettive, Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Seconda Università degli Studi di Napoli

■ INTRODUZIONE

Da numerose regioni del mondo continuano a giungere notifiche di casi di colera causati da *Vibrio cholerae*, sierogruppo O1, biotipo El Tor, responsabile della settima pandemia, iniziata nel 1961 e tuttora in corso. Casi di colera sono stati registrati durante il 2004 in 56 paesi appartenenti a tutti i continenti: i casi ufficiali riportati al WHO (World Health Organization) sono stati 101.373, di cui 95.560 (circa il 94%) da paesi africani, con un tasso di mortalità globale del 2,3% (2.345 casi) [1].

Nel corso del 2005 e nei primi mesi del 2006 epidemie di colera sono state riportate da 52 paesi. Le più estese epidemie si sono verificate in paesi africani: nel Senegal (31.719 casi con 458 decessi), in Guinea-Bissau (25.111 casi con 399 decessi), in Repubblica Democratica del Congo (13430 casi con 244 decessi), in Uganda (4924 casi con 98 decessi), in Nigeria (4477 casi con 174 decessi). Il tasso di mortalità globale in Africa è stato dell'1,78%, ma un tasso estremamente più alto si è osservato in un'epidemia verificatesi in Chad, con 14 decessi su 90 casi (15,56%). In Asia sono stati rilevati 6.824 casi e 40 decessi, con 19 episodi epidemici in 9 differenti paesi: i più estesi sono avvenuti in India con 3155 casi e 6 decessi, in Indonesia con 1.338 casi e 19 decessi e in Iran con 1.133 casi e 11 decessi. Il tasso di mortalità relativo al continente asiatico appare significativamente più basso rispetto a quello riscontrato in Africa (0,62%). In Europa si sono verificati 10 casi, tutti di importazione (4 in Olanda, 2 in Belgio ed 1 rispettivamente in Austria, Finlandia, Norvegia, Polonia). Dalle Americhe sono stati notificati 24 casi (5 in Brasile, 7 in Canada, tutti di importazione, 12 negli Stati Uniti, di cui 7 di importazione e 4 correlati all'uragano Latrina). I casi registrati in Oceania sono stati 3. Si ritiene comunque che le cifre reali

siano più alte di quelle ufficiali, perché molti casi non vengono notificati e ci sono molte lacune nei sistemi di sorveglianza sanitaria. In ogni caso, però, sono in notevole crescita ovunque le popolazioni a rischio di colera e di altre malattie diarroiche epidemiche [2] (Figura 1).

In questa rassegna presentiamo le più recenti acquisizioni su alcuni degli aspetti dell'infezione da *V. cholerae* che hanno ricevuto particolare attenzione in questi ultimi anni, quali l'habitat naturale del vibrione colerico e l'origine delle epidemie di colera, la terapia reidratante orale ed antibiotica, ed i vaccini contro il colera.

Habitat di Vibrio cholerae ed origine delle epidemie

Non esistono portatori a lungo termine di *V. cholerae*, e non esistono serbatoi animali della malattia. Pertanto era convinzione generale, fino a tempi recentissimi, che *V. cholerae* si trasmettesse esclusivamente da persone infette a individui suscettibili e che le periodiche pandemie fossero dovute alle migrazioni delle popolazioni attraverso i continenti. Ma in realtà queste interpretazioni apparivano agli occhi di molti studiosi lacunose e imprecise soprattutto perché non riuscivano a spiegare in che modo *V. cholerae* si fosse mantenuto nell'ambiente per diversi secoli infettando un unico ospite, cioè l'uomo, e per breve periodo, in quanto l'infezione si risolve o con la guarigione o con la morte ma comunque nell'arco di pochi giorni. Per poter dare una risposta a questo e a molti altri interrogativi, nel periodo compreso tra il 1987 e il 1990 una equipe di studiosi che facevano capo alla dottoressa Rita Collwell, Direttore del Dipartimento di Microbiologia dell'Università del Maryland, si stabilì in Bangladesh. Le ricerche di questa equipe consistevano essenzialmente nell'analisi di campioni di acqua prelevata da 10 postazioni che erano

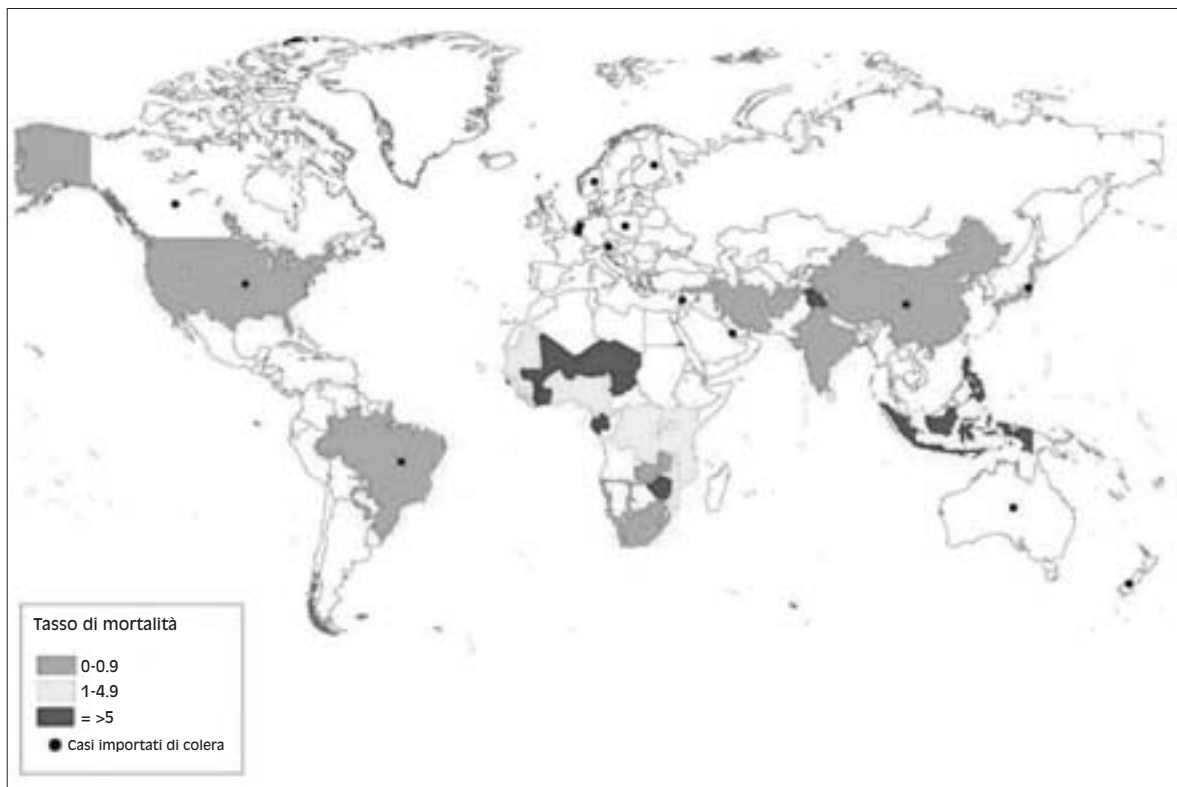


Figura 1 - Nazioni/Aree che hanno riportato casi di colera nel 2005 (Dati WHO 2006).

state allestite in prossimità dei fiumi e dei piccoli stagni che circondano la zona di Matlab, localizzata a 46 Km a sudest dalla capitale Dhaka, nel delta formato dai fiumi Meghna e Gange. Lo studio di tali campioni ha permesso di dimostrare che *V. cholerae*, compresi i sierogruppi O1 e O139, è un normale componente dell'ambiente marino dove si moltiplica e può sopravvivere per anni senza l'intervento dell'uomo: pertanto, *V. cholerae* può essere considerato un patogeno umano facoltativo. Nelle acque *V. cholerae* si ritrova sotto forma libera oppure attaccato alla superficie di piante, alghe verdi filamentose, copepodi, crostacei, insetti, e aggregati di uova di chironomidi [3-5]. Rimane comunque da stabilire se *V. cholerae* sia un componente della normale flora o un simbiote di una determinata specie di plancton. Infatti, ci sono svariati ruoli che *V. cholerae* potrebbe rivestire nell'ambiente marino. Ad esempio, sono stati isolati ceppi di *V. cholerae* che producono melanina. La melanina e i suoi precursori, incluso l'acido omogentisico, probabilmente provocano lo sviluppo e la trasformazione di larve di invertebrati, come le ostriche e i cirripedi [6]. Addirittura, è stato ipotizzato che la stessa tos-

sina colerica abbia un ruolo fisiologico nella regolazione osmotica dell'ospite ambientale dei vibriani [7]. Si presuppone che l'associazione di *V. cholerae* con lo zooplancton o con aggregati di uova lo protegga dalle condizioni ambientali relativamente ostiche incontrate nell'habitat acquatico. *V. cholerae*, così come una grande varietà di microrganismi, è capace di costruire ampie strutture multicellulari su superfici solide, dette "biofilm": il biofilm è un microambiente che favorisce la sopravvivenza e la persistenza perché aumenta la resistenza a vari stress (ad esempio, cloro ed antibiotici) [8]. Oltre alla capacità di formare biofilm, *V. cholerae* ha un'altra strategia di sopravvivenza nell'ambiente acquatico. Infatti, quando le condizioni ambientali, come la temperatura e la concentrazione salina dell'acqua, sono inadeguate o le sostanze nutritive sono carenti, è capace di passare dallo stato metabolicamente attivo ad una particolare forma di quiescenza: si tratta di una forma simile alla spora, ma priva del caratteristico rivestimento, che non può essere coltivata né su terreni standard né su quelli arricchiti ma che mantiene intatta la capacità di colonizzare l'intestino umano e provocare infezione [9]. Il

vibrione in questa forma è stato identificato grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali e con immunofluorescenza [10].

Il ciclo vitale di *V. cholerae* presenta 2 distinte fasi: quella ambientale, che si svolge nelle acque, e quella umana. Queste 2 fasi possono coesistere separatamente, ma spesso si intersecano. Nella figura 2 è rappresentato schematicamente il ciclo vitale di *V. cholerae* secondo le più recenti acquisizioni [11].

La stagionalità delle epidemie di colera in Bangladesh mostra interessanti correlazioni con la stagionalità dello sviluppo del plancton. I risultati dello studio sulla sopravvivenza di *V. cholerae* O1 hanno dimostrato che esso ha la capacità di rimanere in vita in acqua di mare nello stato coltivabile per un tempo sufficientemente lungo da essere trasportato dalle correnti dell'oceano fino a luoghi geograficamente distanti [12]. Altri studi mostrano che, quando *V.*

cholerae si trova in un ambiente con alte concentrazioni di carboidrati ma carenza di nitrati e fosforo, entra nello stato vitale ma non coltivabile [13]. In questo stato, *V. cholerae* può essere trasportato nelle acque marine povere di sostanze nutritive o associato al plancton per diversi mesi e attraverso centinaia di chilometri a seconda delle correnti e delle maree. Allo stesso modo, il microorganismo può persistere in una determinata area geografica per parecchi anni, e ciò dà una spiegazione della ricomparsa del colera dopo anni di quiescenza o di apparente assenza. Importanti fenomeni atmosferici possono influenzare lo spostamento rapido e massiccio di acque marine e di conseguenza rendere conto della diffusione a distanza del vibrione nei vari continenti. Tra il 1990 e il 1995 un fenomeno climatico eccezionale ha interessato le regioni oceaniche sud-occidentali e tropicali del Pacifico. Infatti "El Nino", il periodico

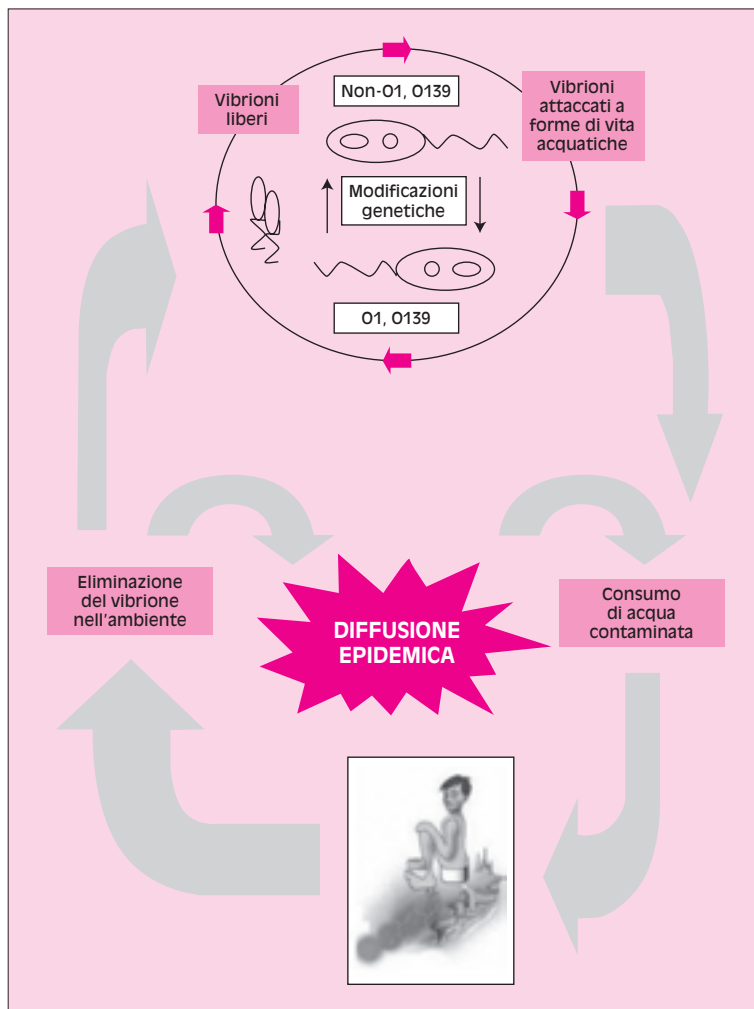


Figura 2 - Ciclo vitale del vibrione colerico (da ref. 11, modificato).

riscaldamento delle acque di superficie, tipico di quell'Oceano, che in genere si verifica ogni 4 anni e non dura più di 12 mesi, a quell'epoca si è prolungato per un periodo di oltre 3 anni. Questo evento inconsueto ha provocato in tal modo un anomalo riscaldamento delle acque oceaniche, in seguito al quale si sono generate correnti che hanno portato in superficie le acque profonde, più fredde ma anche più ricche di plancton. Di conseguenza, agli inizi degli anni novanta nella baia del Bengala e al largo delle coste peruviane, le acque superficiali erano ricoperte da enormi distese di plancton. Questo evento potrebbe spiegare le epidemie di colera che hanno interessato il Perù nel 1991 e il Bangladesh nel 1992 [14]. Durante l'epidemia che ha interessato il continente sudamericano, ad esempio, l'infezione è avanzata dalla città di Chancay (a nord di Lima) fino alla città di Chimbote, sita 400 km più a nord, in un solo giorno. Invece, in Bangladesh ha invaso la terraferma a partire da un focolaio originatosi in alcune isole delle coste meridionali, per altro quasi del tutto segregate dal resto del Paese. La velocità con cui queste ultime epidemie si sono propagate e le enormi distanze raggiunte in così breve tempo dall'infezione avvalorano l'ipotesi che a monte ci sia un fenomeno vasto come lo spostamento del plancton dovuto alle correnti marine.

Si spiega in tal modo non solo la velocità di propagazione, ma anche l'andamento stagionale dell'infezione, rilevato sia in America latina, sia in Bangladesh: ogni volta che vi è un riscaldamento delle acque dell'Oceano e un aumento del plancton in superficie, si ha parallelamente una riaccensione dei focolai epidemici.

Un'altra ipotesi avanzata per spiegare la diffusione globale di *V. cholerae* è che questo possa essere trasportato attraverso gli oceani e tra i vari continenti attaccato alla zavorra delle navi da carico durante i loro spostamenti [15].

Anche se *V. cholerae* fa parte della normale flora degli estuari, i ceppi tossigeni vengono isolati soprattutto in aree contaminate da individui infetti, mentre i ceppi isolati dalle aree distanti dalle zone di infezione in genere sono privi dei geni della tossina colerica [16]. La trasformazione in ceppi patogeni si basa sull'acquisizione di specifici fattori di virulenza, che vengono trasmessi da un batteriofago [17]. Esperimenti condotti su animali hanno dimostrato che l'ambiente intestinale è la sede dove i ceppi di *V. cholerae* acquisiscono i fattori di virulenza [18, 19].

■ RECENTI ACQUISIZIONI SULLA TERAPIA DEL COLERA

Nuova formulazione delle soluzioni reidratanti orali

Le soluzioni reidratanti orali, messe a punto negli anni '60, sono considerate una delle più importanti scoperte in campo medico del ventesimo secolo, soprattutto a causa della loro semplicità, basso costo e facilità di utilizzo [20]. L'uso delle soluzioni reidratanti orali si basa sul principio fisiologico del co-trasporto di soluti attraverso l'epitelio gastrointestinale. Gli studi pubblicati nel 1968 [21, 22] condotti su pazienti colpiti da infezione da *V. cholerae*, avevano dimostrato che, nonostante la diarrea secretoria causasse una perdita massiva con le feci di acqua ed elettroliti, il meccanismo di co-trasporto di glucosio accoppiato al sodio rimaneva intatto e continuava a stimolare il riassorbimento di acqua e sali [23]. Pertanto, la somministrazione per via orale di elettroliti con l'aggiunta di glucosio ne permetteva il rapido assorbimento attraverso la mucosa intestinale.

Nel 1975 la WHO e l'UNICEF (United Nations Children's Fund) hanno raccomandato una soluzione elettrolitica reidratante (Oral Rehydration Solution, ORS) standard, a base di glucosio, per il trattamento e la prevenzione della disidratazione da diarrea di qualsiasi causa ed in qualsiasi età. Sono state approntate nel tempo diverse modificazioni della formulazione standard dell'ORS, alcune basate sull'uso di altri substrati per il trasporto di sodio, quali gli aminoacidi (glicina, alanina e glutamina), altre basate sulla sostituzione del glucosio con carboidrati complessi (ad esempio polvere di riso cotto o altre polveri di cereali). Di queste soluzioni alternative, solo quella contenente polvere di riso al posto del glucosio (Ceralyte) ha dimostrato di essere più efficace dell'ORS standard nel ridurre il numero di scariche diarroiche nei pazienti con colera, apportando contemporaneamente un maggiore introito calorico [24, 25]. Nel 2002 la WHO ha raccomandato una nuova ORS per tutte le diarreie acute, incluso il colera. Questa nuova formulazione dell'ORS ha una ridotta osmolarità, in quanto contiene meno sodio e glucosio rispetto all'ORS standard (Tabella 1). Questa modificazione è stata introdotta allo scopo di ridurre il volume delle feci e di ridurre il ricorso alla terapia endovenosa. Anche l'ORS a ridotta osmolarità, così come l'ORS precedente, esiste come preparato pre-dosato in bustine, facilmente reperibili negli ospedali e negli ambulatori nelle zone di ende-

Tabella 1 - Composizione delle soluzioni reidratanti orali nella vecchia e nella nuova formulazione a ridotta osmolarità.

| | ORS standard (WHO 1975) | ORS a ridotta osmolarità (WHO 2002) |
|---------------------|-------------------------------|---|
| Glucosio (mMol/L) | 111 | 75 |
| Sodio (mEq/L) | 90 | 75 |
| Potassio (mEq/L) | 20 | 20 |
| Cloro (mEq/L) | 80 | 65 |
| Citrato (mMol/L) | 10 | 10 |
| Osmolarità (mOsm/L) | 311 | 245 |

nia; queste bustine vanno sciolte in acqua e possono essere somministrate anche da personale non sanitario.

Numerosi studi hanno stabilito la superiorità dell'ORS a ridotta osmolarità rispetto all'ORS standard nella terapia della diarrea nei bambini, ma esiste qualche preoccupazione sulla sicurezza del loro uso nella diarrea da colera [26, 27]. I bambini e gli adulti affetti da colera perdono rispettivamente circa 100 e 135 mEq di sodio per litro di feci. L'ORS a ridotta osmolarità contiene 75 mEq/litro di sodio, e può pertanto produrre un bilancio negativo del sodio con iponatremia, poliuria e un rischio significativo, anche se basso, di complicanze neurologiche. In una recente metanalisi sono stati esaminati gli studi randomizzati e controllati che confrontano l'ORS a ridotta osmolarità con l'ORS standard nella terapia di soggetti adulti e di bambini con diarrea acuta causata dal colera. I risultati di questa metanalisi, così come quelli di un più recente lavoro, hanno dimostrato che nei pazienti con colera le soluzioni a bassa osmolarità sono associate ad iposodiemia: anche se il rischio non sembra accompagnato da serie conseguenze, l'esperienza con l'ORS a ridotta osmolarità è ancora troppo limitata, e pertanto queste soluzioni vanno usate con cautela nei pazienti con colera, soprattutto quando non è possibile uno stretto monitoraggio [28, 29].

Terapia antibiotica

La terapia antibiotica ha un ruolo secondario nel trattamento del colera, ma è comunque indicata. Il trattamento antibiotico permette infatti di accorciare la durata della malattia e ridurre il numero delle scariche diarroiche [30]. Le tetraci-

cline sono state per oltre 40 anni di prima scelta per il trattamento del colera, in particolare la doxiciclina al dosaggio di 300 mg in singola dose per via orale [31]. Nei bambini di età inferiore a 8 anni e nelle donne in stato di gravidanza, in cui è controindicata la doxiciclina, le opzioni terapeutiche erano rispettivamente il cotrimossazolo (8 mg di trimetoprim-40 mg di sulfametossazolo/kg in 2 somministrazioni per 3 giorni), e l'ampicillina, alla dose di 250 mg ogni 6 ore per 5 giorni. Nelle aree endemiche, dove si sono sviluppate resistenze multiple a questi farmaci, sono stati utilizzati con successo la ciprofloxacina, 250 mg al giorno per 3 giorni, e la norfloxacina, 400 mg in 2 somministrazioni al giorno per 3 giorni [32]. Tuttavia, in India ed in Bangladesh, sono stati segnalati, già dal 1998, ceppi di *V. cholerae* resistenti anche ai chinolonici [33]. I meccanismi alla base della resistenza multipla agli antibiotici di alcuni ceppi di *V. cholerae* sono oggi meglio conosciuti. Sembrano essere implicati nel meccanismo di resistenza plasmidi coniugativi, trasposoni e integroni [34]. La resistenza ai chinolonici sembra essere dovuta, oltre che a mutazioni rilevate nei geni target *gyrA* e *parC*, anche a variazioni del flusso dei chinolonici nel vibrione [35].

I macrolidi sono una valida alternativa alle tetracicline, ma hanno lo svantaggio di richiedere più somministrazioni giornaliere per più giorni [36]. L'azitromicina, un macrolide a lunga durata d'azione, è stata dimostrata efficace nella terapia del colera in età pediatrica quando somministrata in unica dose [37]. Molto recentemente, una singola dose di azitromicina (500 mg) si è dimostrata efficace nella terapia del colera grave anche nell'adulto, così come nei casi di infezione con ceppi che presentano bassa suscettibilità alla ciprofloxacina [38].

■ RECENTI VACCINI CONTRO IL COLERA

Il colera potrebbe essere tenuto sotto controllo da elementari norme igieniche, basate su un adeguato sistema di smaltimento dei rifiuti, una corretta eliminazione delle feci umane ed un'appropriate purificazione delle acque. Questi provvedimenti sono però di difficile attuazione un po' dovunque, ed in particolare nelle aree di maggiore endemia per questa malattia. È proprio l'impossibilità a mettere in atto le summenzionate misure per ridurre la trasmissione del colera che rende necessaria la ricerca di un vaccino efficace.

Poco tempo dopo la scoperta di *V. cholerae*, nel 1880, venne messo a punto un vaccino iniettabile, costituito da una sospensione di vibrioni uccisi con fenolo e calore. Questo vaccino ha una scarsa efficacia, inferiore al 50%, e garantisce un'immunità di durata non superiore ai 6 mesi. La vaccinazione di massa non è praticabile ed è troppo costosa per la popolazione che dovrebbe beneficiarne. Per questi motivi, il vaccino a cellule intere iniettabile è stato del tutto abbandonato.

Da qualche anno sono disponibili in commercio 2 vaccini somministrabili per via orale [39].

Uno di questi consiste in cellule di *V. cholerae* uccise con calore o formalina, insieme alla subunità B della tossina colerica, ottenuta con la tecnica del DNA ricombinante; tale vaccino stimola contemporaneamente la risposta immunitaria sia contro il batterio che contro la tossina. Questo vaccino (Dukoral) è già disponibile in Italia dal 2005. Si somministra in due dosi a distanza di 1-6 settimane l'una dall'altra [40]. Studi condotti in Bangladesh, Perù e Svezia hanno dimostrato che questo vaccino conferisce immunità nell'85-90% dei casi; tale immunità ha inizio circa 7 giorni dalla somministrazione della seconda dose e ha una durata di 6 mesi. In Bangladesh, la protezione garantita dal vaccino diminuiva rapidamente dopo 6 mesi nei bambini piccoli, ma era ancora del 60% dopo due anni nei bambini più grandi e negli adulti [41]. Il secondo vaccino è costituito dal ceppo CVD103HgR di *V. cholerae*; si tratta di microrganismi vivi geneticamente modificati in modo da renderli incapaci di produrre la subunità A, biologicamente attiva, della tossina colerica. Il vaccino è somministrabile in singola dose, come liofilizzato, per via orale [42]. Tale vaccino, prodotto dalla Berna Biotech, in vendita col nome di Mutachol in Canada e Orochol in Europa, non è commercializzato in Italia. Studi controllati in numerosi paesi hanno dimostrato la sicurezza e l'immunogenicità di una singola dose di questo vaccino. La sua efficacia è stata studiata in volontari negli Stati Uniti, e si è scoperto che una singola dose conferisce una protezione del 95% contro *V. cholerae* classico, e il 65% contro El Tor; tale protezione ha inizio circa una settimana dopo la somministrazione [39, 43].

Un altro vaccino costituito da cellule uccise con formalina è stato prodotto e testato in Vietnam. Va somministrato in due dosi, a distanza di una settimana l'una dall'altra. In uno studio condotto tra il 1992 e il 1993 in Vietnam ha mo-

strato un'efficacia protettiva del 66% a 8 mesi in tutti i gruppi di età. L'uso di questo vaccino attualmente è autorizzato solo in Vietnam [44].

Questi vaccini sono inefficaci nei confronti di *V. cholerae* O139 Bengala.

La vaccinazione è raccomandata solo per le persone ad alto rischio, cioè soggetti con acloridria, con pregresso intervento per ulcera gastrica o in terapia con antiacidi, che risiedono in aree endemiche a basso livello igienico.

Attualmente il WHO non consiglia la vaccinazione ai viaggiatori che si recano nelle aree endemiche, perché il pericolo di contagio è basso (0,001-0,01% per mese di permanenza in un Paese in via di sviluppo) e quindi è sufficiente adottare le comuni norme igieniche [45].

Altri vaccini vivi o uccisi somministrabili per via orale sono in via di sviluppo e potrebbero essere utilizzati nel futuro: un vaccino orale a cellule vive, ottenuto dai ceppi CDV 111 di *V. cholerae* El Tor, sierogruppo O1; un vaccino a cellule vive, attenuate, somministrabile in singola dose per via orale (Perù 15); un vaccino a cellule vive attenuate ottenute dal ceppo CDV 112 di *V. cholerae* O139 [46-48]. Il problema più rilevante riguardo a questi nuovi vaccini orali sarà renderli sufficientemente economici e sviluppare una formulazione che possa essere velocemente distribuita alle masse di popolazioni a rischio.

■ CONCLUSIONI

Alla luce delle più recenti conoscenze, *Vibrio cholerae* può essere considerato un batterio marino autoctono, che colonizza e si sviluppa nell'intestino umano durante le infezioni mentre trascorre i periodi tra le epidemie nel suo habitat naturale, cioè gli estuari. Pertanto *V. cholerae* non può essere eradicato, proprio perché è parte del normale ambiente delle acque del nostro pianeta. Piuttosto, gli esseri umani devono imparare a convivere con *V. cholerae*. È pertanto indispensabile una sempre maggiore disponibilità ed un appropriato uso delle soluzioni reidratanti, al fine di ridurre il più possibile i decessi per colera. Inoltre, è opportuno una diffusione della pratica vaccinale contro il colera che, a differenza di quanto ritenuto in passato, può giocare un ruolo importante nella prevenzione della malattia grazie all'efficacia dei più nuovi vaccini.

Key words: cholera, epidemiology, therapy, vaccine

RIASSUNTO

Il colera è ancora presente in molti Paesi del mondo e continua a mietere numerose vittime. Le più recenti acquisizioni sull'habitat del vibrione colerico e sull'origine delle epidemie indicano che c'è un pericolo costante di diffusione globale del colera a partire dalle sedi endemiche, ed il rischio

di emergenza di nuovi sierogruppi patogeni. In questa rassegna sono riportate le più recenti ipotesi sull'epidemiologia del colera, in particolare sull'origine delle epidemie. Sono inoltre riportate le più recenti acquisizioni in tema di terapia e profilassi del colera.

SUMMARY

Cholera is still a medical problem in several countries, leading to the death of a large number of affected individuals. Recent acquisitions on the epidemiology of Vibrio cholerae suggest that there is a risk of global spreading of the disease and of the development of new

pathogenic strains. We have reviewed the most recent hypothesis on the ecology of cholera, in particular on the origin of epidemics. Recent developments in the fields of therapy and prophylaxis of cholera are also reported.

■ BIBLIOGRAFIA

- [1] Weekly epidemiological record. *World Health Organization* 80, 30, 261-268, 2005.
- [2] Weekly epidemiological record. *World Health Organization* 81, 31, 297-308, 2006.
- [3] Colwell R.R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274, 2025-2601, 1996.
- [4] Islam M.S., Drasar B.S., Sack R.B. Probabile role of blue green algae in maintaining endemicità and seasonality of colera in Bangladesh: a hypothesis. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 12, 245-256, 1994.
- [5] Broza M., Halpern M. Pathogen reservoirs: chironomid egg masses and *Vibrio cholerae*. *Nature* 412, 40, 2001.
- [6] Kotob S.I., Coon S.L., Quintero E.J., Weiner R.M. Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholerae*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1220-1222, 1995.
- [7] Colwell R.R., Huq A. Molecular to global Perspectives, In *Vibrio cholerae and cholera* (Wacchsmuth I.K., Osvik O., Blake P.A., Eds.) 1994, 117-133. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- [8] Watnick P.L., Lauriano C.M., Klose K.E., Croal L., Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. microbiol.* 39, 223-235, 2001.
- [9] Colwell R.R. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Infect. Chemother.* 6, 121-125, 2000.
- [10] Huq A., Colwell R.R., Rohman R. et al. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent monoclonal antibody and culture

- methods. *Appl. Environm. Microbiol.* 56, 2370-2373, 1990.
- [11] Sack D.A., Bradley Sack R., Balakrish Nair G., Siddique A.K. Cholera. *Lancet* 363, 223-233, 2004.
- [12] Munro P.M. Colwell R.R. Fate of *Vibrio cholerae* O1 in seawater microcosms *Water Res.* 30, 47-50, 1996.
- [13] Sokolenko A.V., Lomov M., Titova S.V., Mironova A.V., Men'shikova E.A. Dynamics of the reversible transition of *Vibrio cholerae* into the uncultivable state in the presence of organic and inorganic microcosmic components. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 4, 27-32, 2005.
- [14] Koelle K., Rodo X., Pascual M., Yunus M., Mostafa G. Refractory periods and climate forcing in cholera dynamics. *Nature* 436, 696-700, 2005.
- [15] McCarty S.A., Khambaty F.M. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other non potable waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2597-2606, 1994.
- [16] Faruque S.M., Asaldulghani, Saha M.N., et al. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTXphi: molecular basis for origination of new strains with epidemic potential. *Infect. Immun.* 66, 5819-5825, 1998.
- [17] Faruque S.M., Asaldulghani, Alim A.R., Albert M.J., Islam K.M., Mekalanos J.J. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infect. Immun.* 66, 3752-3757, 1998.
- [18] Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272, 1910-1914, 1996.
- [19] Lazar S., Waldor M.K. ToxR-independent ex-

- pression of cholera toxin from the replicative form CTXphi. *Infect. Immun.* 66, 394-397, 1998.
- [20] Water with sugar and salt (editorial). *Lancet* 2, 300-301, 1978.
- [21] Pierce N., Banwell J., Mitra L. et al. Effect of intragastric glucose-electrolyte infusion upon water electrolyte balance in Asiatic cholera. *Gastroenterology* 55, 333-342, 1998.
- [22] Hirshhom N., Kinzie J., Sachar D., et al. Decrease in net stool output in cholera during intestinal perfusion with glucose-containing solution. *N. Engl. J. Med.* 279, 176-181, 1968.
- [23] Field M. Intestinal transport and the pathophysiology of diarrhoea. *J. Clin. Invest.* 111, 931-943, 2003.
- [24] Molla A.M., Sarker S.A., Hossain M., Molla A., Greenough W.B. 3rd. Rice-powder electrolyte solution as oral-therapy in diarrhoea due to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Lancet* 12, 1, 1317-1319, 1982.
- [25] Zaman K., Yunus M., Rahman A., Chowdhury H.R., Sack D.A. Efficacy of a packaged rice oral rehydration solution among children with cholera and cholera-like illness. *Acta Paediatr.* 90, 505-510, 2001.
- [26] Khan A.M., Sarker S.A., Alam N.H., Hossain M.S., Fuchs G.J., Salam M.A. Low osmolar oral rehydration salts solution in the treatment of acute watery diarrhoea in neonates and young infants: a randomized, controlled clinical trial. *J. Health Popul. Nutr.* 23, 52-57, 2005.
- [27] Sentongo T.A. The use of oral rehydration solutions in children and adults. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 6, 307-313, 2004.
- [28] Murphy C., Hahn S., Volmink J., Reduced osmolarity oral rehydration solution for treating cholera. *Cochrane Database Syst. Rev.* 18, CD003754, 2004.
- [29] Alam N.H., Yunus M., Faruque A.S., et al.. Symptomatic hyponatremia during treatment of dehydrating diarrheal disease with reduced osmolarity oral rehydration solution. *JAMA.* 296, 567-573, 2006.
- [30] Lindebaum J., Greenough W.B., Islam M.R. Antibiotic therapy of cholera. *Bull. World Health Organ.* 36, 871-873, 1967.
- [31] Sack D.A., Islam S., Rabbani H., Islam A. Single-dose doxycycline for cholera. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 462-64, 1978.
- [32] Ryzhko I.V., Dudina N.A., Lomov M., Shut'ko A.G., Tsuraeva R.I., Anisimov B.I. Activity of 22 antibacterials against O1 and O139 serogroup *Vibrio cholerae* strains isolated from humans within 1927-2005 in various regions of the world. *Antibiot. Khimioter.* 50, 38-42, 2005.
- [33] Mukhopadhyay A.K., Basu I., Bhattacharya S.K., Bhattacharya M.K., Nair G.B. Emergence of fluoroquinolone resistance in strains of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalized patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42, 206-207, 1998.
- [34] Hochhut B., Lotfi Y., Mazel D., Faruque S.M., Woodgate R., Waldor M.K. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2991-3000, 2001.
- [35] Baranwal S., Dey K., Ramamurthy T., Nair G.B., Kundu M. Role of active efflux in association with target gene mutations in fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2676-2678, 2002.
- [36] The treatment of diarrhoea. A manual for physicians and other senior health workers. *World Health Organization* 2005.
- [37] Khan W.A., Saha D., Rahman A., Salam M.A., Bogaerts J., Bennish M.L. Comparison of single-dose azithromycin and 12-dose, 3-day erythromycin for childhood cholera: a randomized, double-blind trial. *Lancet* 360, 1722-1727, 2002.
- [38] Saha D., Karim M.M., Khan W.A., Ahmed S., Salam M.A., Bennish M.L. Single-dose azithromycin for the treatment of cholera in adults. *N. Engl. J. Med.* 354, 2452-2462, 2006.
- [39] Hill D.R., Ford L., Lalloo D.G. Oral cholera vaccines: use in clinical practice. *Lancet Infect. Dis.* 6, 361-373, 2006.
- [40] Ragot C., Garnotel E., Vedy S., Morillon M. Dukoral, oral cholera vaccine. *Med. Trop.* 66, 3, 237-239, 2006.
- [41] van Loon F.P., Clemens J.D., Chakraborty J., et al. Field trial of inactivated oral cholera vaccines in Bangladesh: results from 5 years of follow-up. *Vaccine* 14, 162-166, 1996.
- [42] Tacket C.O., Cohen M.B., Wasserman S.S., et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. *Infect. Immun.* 67, 6341-6345, 1999.
- [43] Levine M.M., Kaper J.B., Herrington D., et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD 103 and CVD 103-HgR. *Lancet* 2, 467-470, 1988.
- [44] Trach D.D., Clemens J.D., Ke N.T., et al. Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Vietnam. *Lancet* 349, 231-235, 1997.
- [45] Esposito R., Antinori S. Il rischio infettivo per i viaggiatori. In *Malattie infettive VI ed.* (Moroni M., Esposito R., De Lalla F., Eds) 2003, pp 885-896. Masson, Milano.
- [46] Tacket C.O., Kotloff K.L., Losonsky G., et al. Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *Vibrio cholerae* O1 vaccine strain CVD 111. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 533-537, 1997.
- [47] Cohen M.B., Giannella R.A., Bean J., 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. *Infect. Immun.* 70, 1965-1970, 2002.
- [48] Tacket C.O., Losonsky G., Cataro J.P., et al. Initial clinical studies of CVD 112 *Vibrio cholerae* live oral vaccine: a safety and efficacy against experimental challenge. *J. Infect. Dis.* 172, 883-886, 1995.