

مروری بر واکسن های مهندسی ژنتیک شده باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک

راضیه خالصی¹، جعفر سلیمیان^{2*}، سیدمحمد مؤذنی³، فرید عزیزی جلیلیان⁴

- 1) گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
- 2) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)
- 3) گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
- 4) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/8/20

تاریخ پذیرش: 91/11/28

چکیده

اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک رایج ترین عامل باکتریایی مولد اسهال در جهان است. این باکتری دارای تعدادی عامل حدت زا است که از جمله آن ها؛ فاکتورهای کلونیزاسیون، توکسین حساس به حرارت و یا توکسین مقاوم به حرارت می باشد. باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک از طریق فاکتورهای کلونیزاسیون به سطح سلول اپیتلیال روده متصل و با ترشح توکسین موجب ایجاد اسهال می شود. مطالعات مولکولی بر روند بیماری زایی باکتری نشان می دهد که رویکردهای مختلفی جهت پیشگیری از این عفونت وجود دارد. بهترین راه ممکن، طراحی و تولید واکسن کارآمد است که توانایی القای ایمنی محافظتی در برابر اکثر سویه های باکتری را داشته باشد. جهت طراحی واکسن از مولکول(های) کاندیدای واکسنی استفاده می شود که علاوه بر خاصیت ایمنی زایی و بی خطر بودن، شیوع زیادی بین انواع سویه ها داشته و در عین حال واجد اپی توپ های محافظت شده و مشترک باشند. در این مقاله به مروری از اطلاعات و نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در زمینه واکسن های ETEC پرداخته، هم چنین به اهمیت باکتری و بیماری زایی آن اشاراتی کرده است.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک، بیماری زایی، عوامل حدت زا، واکسن

*نویسنده مسئول: گروه ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم زیستی، دانشگاه امام حسین (ع)

Email: jafarsalimyan@yahoo.com

مقدمه

در ابتدای قرن بیست و یکم، عفونت های روده ای و بیماری های اسهالی هنوز یکی از مهم ترین مسائل و معضلات بهداشتی-درمانی جوامع بشری به ویژه در کشورهای در حال توسعه به حساب می آیند. بر اساس آمارهای جهانی، پس از بیماری های قلبی - عروقی و سرطان، این بیماری ها یکی از بزرگ ترین علل مرگ و میر انسان ها به شمار می آیند،(1) به طوری که اسهال عفونی حاد یکی از دلایل ناتوانی و مرگ تقریبی 2/5-1/6 میلیون کودک در سال می باشد،(۲،۳). باکتری ها، ویروس ها، انگل ها و قارچ ها عوامل اصلی مولد بیماری اسهالی حاد هستند.(4)

تاریخچه

یکی از عوامل باکتریایی مولد اسهال در کودکان اشریشیاکلی (ای.کلی) است،(5)، که در سال 1940 با عنوان ای.کلی انتروپاتوژن مطرح گردید،(6)، در سال 1961 طی آزمایشات صورت گرفته بر روی خرگوش و انسان، ثابت شد که این باکتری موجب تجمع مایعات در روده خرگوش و ایجاد اسهال در فرد داوطلب می شود،(7)، در اصل تاریخچه ای.کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) به سال 1956 در کلکته باز می گردد. در آن زمان De و همکارانش باکتری ای.کلی را از بالغین و کودکان مبتلا به اسهالی شبیه وبا جدا کرده و نشان دادند که این باکتری همانند وبا باعث تجمع مایعات در روده خرگوش می شود، اما آن ها این مایع را از نظر وجود انتروتوکسین مورد بررسی قرار ندادند،(۸،۹). سر انجام در سال 1968، باکتری ETEC به صورت خالص از افراد مبتلا به بیماری شبیه وبا در کلکته جدا گردید، این میکروارگانیسم توانایی تولید انتروتوکسین و فاکتورهای کلونیزاسیون را داشت،(9). این یافته ها با انجام مطالعاتی بر روی افراد داوطلب تأیید شد،(۱۰،۱۱)، و با نتایج حاصل از مطالعات داکای بنگلادش قوت گرفت،(12-15). در نهایت، با مطالعات بر روی تقریباً 20 درصد موارد در چند کشور در حال توسعه مشخص گردید که ETEC رایج ترین پاتوژن روده ای باکتریایی است.(16-18)

همه گیری شناسی

ETEC هنوز هم به عنوان یکی از عوامل اسهال غیرالتهابی در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود،(۱۹،۲۰). این باکتری عامل 15-11 درصد اسهال کودکان زیر 5 سال در کشورهای جهان سوم و شایع ترین علت اسهال مسافری به این مناطق و نیز عامل نسبتاً شایع اسهال در نوزاد حیوانات می باشد. کودکان کشورهای در حال توسعه تا سن 5 سالگی سالانه در حدود 3/2 دوره اسهالی را تجربه می کنند،(18). پس از آن وقوع آلودگی های ETEC در افراد 15-5 سال کاهش می یابد، علاوه بر این، افراد بالای 65 سال نیز مستعد آلودگی با ETEC هستند. علت این کاهش و افزایش آلودگی، می تواند ناشی از اثر فاکتورهای محیطی و ایمونولوژیکی باشد.(۲۱،۲۲)

بیماری

بیماری اسهالی با بلع 10^6-10^1 عدد باکتری ETEC شروع می شود،(۲۳،۲۴)، و معمولاً آلودگی به وسیله غذا یا آب آلوده با مدفوع منتقل می گردد،(25). اسهال ایجاد شده به وسیله ETEC، از حالت خفیف تا شدید،(26)، و به صورت آبکی و بدون خون، همراه با درد غیرطبیعی ناحیه شکمی، استفراغ و گاهی همراه با تب، سردرد و درد عضلانی است،(۲۳،۲۷). دوره کمون 50-14 ساعت بوده،(23)، و آلودگی زمانی رخ می دهد که شخص غذا، نوشیدنی یا یخ حاوی باکتری را خورده باشد،(18). بیماران بالغ ممکن است روزانه تا 10 لیتر آب را به صورت مدفوع آبکی از دست دهند،(۱۸،۲۳،۲۸). کاهش آب و الکترولیت ها منجر به دهیدراتاسیون از حالت ملایم تا شدید می شود که در حالت شدید بستری کردن بیمار ضروری است. بیماری، 3-1 روز و نهایتاً 4-3 روز پس از در معرض قرار گرفتن با باکتری گسترش می یابد و می تواند بیشتر نیز به طول انجامد.(۱۸،۲۳)

پیشگیری و درمان

رایج ترین اصول در مدیریت و درمان بیماری اسهال ناشی از ETEC، تامین مایعات و دارودرمانی است. هنگام شروع بیماری، عوامل ضد میکروبی (آنتی بیوتیک ها) می توانند در کوتاه کردن طول

روده حاصل شده اند، (25). ایمنی زایی مؤثر علیه این پاتوژن روده ای، ترشح آنتی بادی های مخاطی را تحریک می کند، (36). بنا بر این ارزیابی پاسخ های ایمنی مخاطی در بررسی ایمونوژنیسیته واکسن های مختلف علیه این باکتری از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. (25)

یکی از مسائل مهمی که در طراحی واکسن علیه این بیماری مدنظر است یافتن ملکول (های) کاندیدایی است که در بیشتر سویه ها تولید شود و بتواند برای مدت طولانی در 70 درصد افراد، ایجاد ایمنی نماید، (۳۷، ۳۳، ۳۲، ۲۳). علاوه بر آن واکسن های طراحی شده علیه این بیماری بایستی توانایی ایجاد ایمنی مؤثر در نوزادان زیر یک سال را داشته باشد، زیرا بالاترین خطر اسهال ناشی از ETEC مربوط به کودکان در گروه سنی 6-11 ماه است. در ضمن، تهیه واکسن نباید پرهزینه باشد، زیرا اغلب ابتلا به پاتوژن های روده ای به طور هم زمان رخ می دهد و این پاتوژن ها به صورت هم افزایی عمل می کنند. در این میان طراحی واکسنی که بتواند باعث مصونیت هم زمان به چند پاتوژن شود، مطلوب است، (38). واکسن طراحی شده در صورتی که قادر به کنترل بیماری باشد می تواند تاثیر مهمی در کاهش موارد بیماری و مرگ و میر حاصل از آن داشته باشد، (۳۹، ۴۰). بنا بر این، شناخت عوامل حدت زا و مکانیسم های بیماری زایی باکتری جهت شناسایی و تهیه کاندیداهای واکسن اهمیت زیادی دارد. این مقاله با هدف بررسی و توضیح عوامل حدت زایی که در توسعه واکسن علیه ETEC می توانند مفید واقع شوند، ارائه گردید.

مکانیسم بیماری زایی و عوامل حدت زا

آلودگی با بلع باکتری و ورود آن به روده کوچک آغاز شده و سیستم ایمنی به مقابله با آن می پردازد، (۲۴، ۲۳). بسیاری از سویه های ETEC برای غلبه بر مکانیسم های دفاعی از فیمبریه یا فاکتورهای کلونیزاسیون (CFs) برای چسبیدن به روده استفاده می کنند که اولین مرحله حیاتی در بیماری زایی ETEC می باشد، (۴۲، ۴۱). به دنبال اتصال باکتری به اپی تلیال روده، کلونیزاسیون در سطح سلول ها صورت می پذیرد، (۲۴، ۲۳). مرحله مهم، ترشح

بیماری و کنترل آن مؤثر باشند، اما جایگزینی آب و الکتروولیت اهمیت بیشتری دارد، (۲۹، ۲۴، ۱۸). اشریشیاکلی به طور طبیعی نسبت به انواع آنتی بیوتیک ها از جمله تتراسایکلین، آمپی سیلین، اریتروماکسین، نئوماکسین، استرپتوماکسین، تری متوپریم و سولفونامیدها حساس می باشد. اگرچه این داروها برای اسهال شدید مسافران تجویز می شوند، اما مقاومت دارویی نیز گزارش شده و سویه های مقاوم، به دلیل توان بالای این باکتری در تبادل پلاسمیدهای مقاومت، روز به روز در حال افزایش هستند، (۳۱، ۳۰، ۲۴، ۱۸). مشخص شده، 79-90 درصد سویه های ETEC به آمپی سیلین، 37-28 درصد به تری متوپریم و مقدار کمی نیز به افلوکسازین مقاومند، (32). علاوه بر آن، این سویه ها در حال مقاومت به اریتروماکسین هستند و استراتژی های جدید درمانی باید برای آن ها طراحی شود، (۳۱، ۳۰، ۱۸). این امر باعث شده آمار تعداد مرگ و میر به جهت ناکامی در درمان مؤثر رو به افزایش باشد. اگر چه با بهبود کیفیت آب ها و افزایش سطح بهداشت می توان از شیوع اسهال جلوگیری کرد اما این عمل با انبوه جمعیت در آینده و محدودیت منابع ممکن نخواهد بود، (23). از این رو کنترل بیماری، سازمان های بهداشتی متعددی نظیر سازمان بهداشت جهانی (WHO) را بر آن داشته تا به دنبال طراحی و تهیه واکسن باشند. (۳۳، ۲۳)

پاسخ های ایمنی علیه ETEC

همانند سایر التهابات روده ای، وقوع بیماری اسهالی ناشی از ETEC با افزایش سن کاهش می یابد که تأییدی بر ایجاد ایمنی اکتسابی طبیعی علیه باکتری پس از آلوده شدن می باشد، (34). این پدیده در مسافرانی که زمان طولانی تری را در مناطق اندمیک سپری می کنند و نیز داوطلبانی که برای بار دوم با سویه های همسان ETEC مواجه می شوند، دیده شده است، (18)، که نشان از ایجاد ایمنی مؤثر علیه باکتری ETEC پس از آلودگی با آن می باشد. بنا بر این، تهیه واکسن علیه ETEC اساساً امکان پذیر است، (35). آلودگی با ETEC به روده باریک محدود می شود و بیشتر آنتی بادی های تولید شده از تحریک موضعی

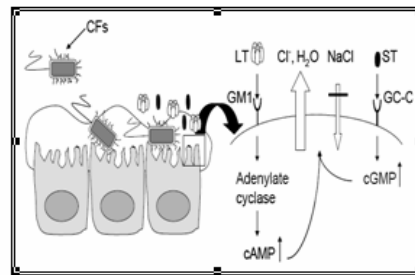
پروتئین هایی به نام انتروتوکسین است که با اتصال به رسپتور مخصوص در سطح اپی تلیال باعث ایجاد تغییراتی در این سلول ها می شوند، (42-45). این انتروتوکسین ها، انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) و/یا مقاوم به حرارت (ST) بوده، (۲۴،۴۶)، و این امکان وجود دارد که هر دوی آن ها به طور مستقل باعث ایجاد اسهال شوند. نسبت سویه های ETEC که تنها واجد ST، LT و یا LT/ST به صورت توأم باشند متفاوت است. در برخی مطالعات یک سوم تمام سویه ها واجد تنها ST، یک سوم واجد تنها LT و یک سوم واجد LT/ST می باشد، (18). هم چنین، بررسی های فیلوژنتیکی نشان می دهد که وجود این توکسین ها برای ایجاد یک کلون پاتوژن ضروری است، (47). شکل شماره 1، رخدادهای و مکانیسم ایجاد اسهال در ETEC را نشان می دهد، (23). با توجه به مکانیسم، CFA، LT و ST، عوامل اصلی بیماری زایی باکتری به شمار می روند. (۴۸،۴۹)

فاکتورهای کلونیزاسیون

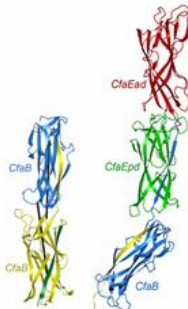
اصطلاح فاکتور کلونیزاسیون و آنتی ژن کلونیزاسیون (CFA) برای سویه های مختلف ETEC کاربرد دارد و به ادهسین هایی اشاره می کند که

کلونیزاسیون ارگانیزم را در روده تحریک می کنند. بیش از 25 فاکتور کلونیزاسیون در سویه های ETEC انسانی شناسایی شده است. تنوع فاکتورهای کلونیزاسیون به دلیل تفاوت در توالی های آمینواسیدی زیر واحدهای ساختاری فیمبریه چسبنده می باشد. بنا بر این پروتئین های چسبنده ETEC را بر اساس تنوع ژنتیکی و آنتی ژنی می توان در 5 گروه طبقه بندی کرد، (50):

گروه اول) گروه شبه CFA/I؛ شامل CFA/I، CS1، CS2، CS4، CS14، CS17، CS19، که از نظر ژنتیکی با یکدیگر مرتبط و توالی آمینواسیدی زیر واحدهای اصلی بسیار مشابه است. فیمبریه های شبه CFA/I، ارگانل های فیلامنتی و سختی متشکل از صدها کپی یک زیر واحد پروتئینی اند، (شکل شماره 2)، که تعیین کننده ویژگی ایمونولوژیکی فیمبریه است، (51). در گذشته تصور بر این بود که اعضای این گروه به لحاظ آنتی ژنی ارتباطی با یکدیگر نداشته باشند، اما اکنون اپی توپ های مشترکی شناسایی شده که در سطح زیر واحدهای فیمبریایی عرضه نمی شوند. (24)



شکل شماره 1. چگونگی بیماری زایی ETEC (23)



شکل شماره 2. ساختار فاکتورهای کلونیزاسیون CfaE و CfaB (140)

سطح سلول های اپی تلیال را افزایش می دهد و باعث کلونیزاسیون باکتری در سطح روده کوچک می شود، (۵۸،۵۹). LT از طریق زیر واحد B به رسپتور GM1 به سلول های اپی تلیال روده اتصال می یابد، (57)، و با واسطه اندوسیتوز وارد سلول می شود. مطالعات نشان می دهد، اتصال باکتری به سلول هدف در انتقال توکسین نقش دارد، (۶۰،۶۱). پس از ورود توکسین به داخل سلول، بخش A1 توکسین با فاکتورهای ADP-ریبوزیله کننده (AFRs) واکنش داده و با فعالیت آنزیمی خود ADP-ریبوز را از مولکول نیکوتین امید آدنین دی نوکلئوتید (NAD) جدا و به Gsa منتقل می کند. این عمل باعث مهار فعالیت GTP آزی و فعال سازی دائمی آدنیلات سیکلاز می شود، (۶۰،۶۲). این فعالیت موجب افزایش cAMP، تحریک ترشح کلراید به درون سلول های کریپتیک روده و مهار کلرید سدیم در نوک ویلی ها شده و اسهال آبکی ایجاد می شود. (۶۳،۶۴)

انتروتوکسین ST

توکسین ST یک پپتید با وزن مولکولی 2-1/5 کیلودالتون، متشکل از 18 تا 19 آمینواسید و فاقد خاصیت آنتی ژنیسته است. (شکل شماره 4) این توکسین دارای یک ساختمان ثانویه مارپیچی بوده و برای فعالیت نیازمند تعداد زیادی آمینواسیدسیستئین است که در تماس با عوامل احیاء کننده منجر به غیرفعال شدن توکسین می شوند، (63). هم چنین، ST از طریق افزایش سطح کلسیم درون سلولی باعث کنترل تقسیم سلولی می شود، (64). این توکسین دارای دو واریانت STp و STh است. هر دو واریانت مکانیسم عمل یکسانی دارند؛ به طوری که پس از ترشح به دمین خارج سلولی گوانیلیل سیکلاز C (GC-C) سطح سلول های اپی تلیال روده کوچک متصل می شوند. این میانکنش باعث فعال سازی دمین کاتالیتیک داخل سلولی آنزیم و افزایش سطح cGMP می گردد، (۴۵،۶۳). افزایش سطح cGMP موجب فعال سازی پروتئین کیناز II وابسته به cGMP و فسفریله شدن تنظیم کننده تراغشایی سیستیک فیبروزیس می شود، (65). این فرایند موجب ترشح

گروه دوم) توالی آمینواسیدی CS18، CS20، CS13، CS5 مشابه زیر واحدهای فیمبریایی سویه های حیوانی است. هم چنین، الگوی هماگلوتیناسیون، ساختار و اندازه CS4 و CS5 نیز با یکدیگر مشابه است.

گروه سوم) از نظر ژنتیکی مشابه فیمبریه سویه های غیر ETEC می باشند. برای مثال CS15 هومولوگ فیمبریه های سالمونلا است.

گروه چهارم) CFA/III و فیمبریه لانگوس متعلق به این گروهند.

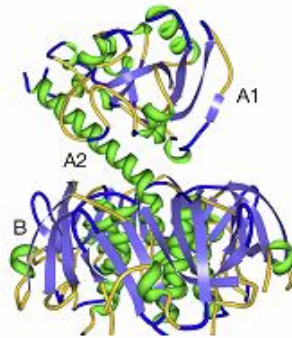
گروه پنجم) این گروه شامل CS3، CS10، CS11 و CS12 بوده و تشابهی با هیچ یک از فیمبریه های شناخته شده ندارد. (15)

توکسین های *ST*، *LT* و *EAST1*

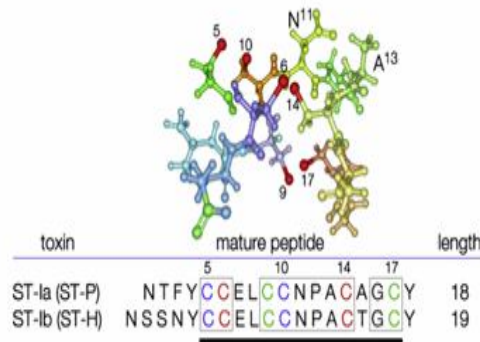
انتروتوکسین *LT*

ژن تولیدکننده LT بر روی پلاسמיד قرار دارد. این ژن یک پروتئین هتروگزامر با وزن مولکولی تقریبی 86 کیلودالتون را کد می کند. این توکسین از نظر فیزیولوژیکی، ساختاری، آنتی ژنی و واکنش های ایمونولوژیک بسیار شبیه توکسین کلرا (CT) است و از نظر هومولوژی نوکلئوتید و آمینواسید 80 درصد با آن مشابهت دارد. هر دو توکسین دارای عملکرد مشابهی بوده و متعلق به خانواده توکسین های AB5 هستند. هر یک حاوی یک حلقه پنتامری از پنج زیر واحد اتصال (LTB) یکسان با وزن مولکولی 11/5 کیلودالتون و یک زیر واحد فعال توکسیک (LTA) با وزن مولکولی 28 کیلودالتون می باشند، (۵۳،۵۲،۴۴،۴۳،۲۳). زیر واحد A دارای دو دمین A1 و A2 است که با یک پیوند دی سولفیدی به یکدیگر متصلند و درون پنتامر B قرار می گیرد، (شکل شماره 3) (52). جهت ترشح توکسین، ابتدا پپتید راهنمای انتهای آمین جدا می شود، سپس زیر واحدهای پروتئینی از طریق غشای داخلی وارد فضای پری پلاسمی شده و هولوتوکسین شکل می گیرد، (54-56). هر دو توکسین LT و CT از طریق دستگاه ترشحاتی نوع II به خارج از میکروارگانیزم ترشح می شوند، (57). ترشح LT، اتصال ETEC به

کلراید به سلول های کریپتیک روده و مپهار جذب کلریدسدیم شده و منجر به بروز پاسخ ترشحي و ایجاد اسهال می گردد. (۶۳،۶۶)



شکل شماره 3. ساختار توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC و زیرواحدهای A و B (61)



شکل شماره 4. ساختار توکسین مقاوم به حرارت باکتری ETEC (61)

عوامل کلونیزاسیون می باشد. علاوه بر این آنتی ژن ها، باکتری توانایی تولید دو توکسین LT و ST را نیز دارد، (49). کاندیدای واکسن مناسب علیه ETEC باید توانایی ایجاد پاسخ های ایمنی مخاطی قوی در روده را داشته باشد، (۲۴،۷۱). مطالعات نشان داده اند که استفاده از ملکول CFA/I به تنهایی باعث ایجاد 50 درصد ایمنی در فرد می شود، در حالی که به کار بردن چند عامل کلونیزاسیون CFA/I همراه با LTB باعث ایجاد ایمنی در 80-90 درصد افراد می شود، (72). بنا بر این با تولید واکسن هایی بر پایه توکسین و عامل کلونیزاسیون می توان با کمترین تعداد آنتی ژن بیشترین محافظت را علیه سویه های مختلف ایجاد کرد. آنتی ژن های LT و CFA/I همراه با سایر

توکسین انترواگریگیتیو مقاوم به حرارت توکسین EAST1 از نظر ساختمانی شباهت زیادی به پپتید STI دارد و همانند آن موجب افزایش سطح cGMP می گردد، (۶۷،۶۸). این توکسین از ژن ast کد می شود و اغلب در بیماری زاهای روده ای مانند ETEC یافت می شود، (۶۹،۷۰). مطالعات تایید کرده است که ژن این توکسین توسط یک عنصر متحرک حمل می شود، (68)

کاندیداهای واکسن علیه ETEC انواع مختلف آنتی ژن در سطح باکتری ETEC بیان می شوند که می توان از آن ها به عنوان کاندیدای تولید واکسن بهره جست. از جمله آن ها؛ لیپوپلی ساکارید (سروگروپ O)، فلاژل (سروگروپ H) و

می دهند. این محافظت بیشتر علیه ETEC دیده شد و 3-6 ماه پس از دریافت دو دوز واکسن با فاصله 3 تا 9 ماه ادامه داشت، (78). این واکسن تحت لیسانس شرکت داک اورال بوده و برای استفاده در 15 کشور دنیا دارای مجوز مصرف است. (۲۴،۷۱)

به دلیل اهمیت LTB در تولید واکسن، خالصی و همکاران، ژن ltb را به وکتور pET28a انتقال داده و درون ای. کلی همسانه سازی کردند، (۷۹،۸۰). هم چنین، بیان این ژن بررسی و پس از تخلیص پروتئین LTB نو ترکیب (rLTB)، آنتی بادی علیه آن در موش تولید شد، این آنتی بادی می تواند توکسین LT را خشی نماید، (81-83). علاوه بر این مطالعات، مؤذنی و همکاران ژن LTB را در مخمر ساکارومایسس سرویزیه بیان کردند که به عنوان یک کاندیدای واکسن ارزان قیمت خوراکی معرفی گردید. (84)

نوارهای قابل جذب توکسین حساس به حرارت

ایمن سازی از راه پوست روشی است که در آن آنتی ژن همراه با ادجوان از طریق یک برچسب با پوست تماس می یابد، (77). در یک آزمون که توسط شرکت آیومای صورت گرفت، توکسین های LT و CT که از طریق برچسب در معرض پوست موش قرار داده شده بودند خاصیت ایمنوژنی و ادجوانی قوی نشان دادند. برای تهیه نوارهای حامل LT، تخلیص توکسین امری ضروری است. طی تحقیقات صورت گرفته، خالصی و همکاران توانستند توکسین LT را از ETEC تخلیص نمایند و نشان دادند که آنتی بادی های ضد LT به آسانی قادرند تا به توکسین آزاد متصل شوند، (۸۵،۸۶). بنا بر این از این توکسین می توان جهت تولید نوارهای حاوی LT استفاده کرد. در یک آزمون بالینی که با همکاری مرکز تحقیقات ایمن سازی دانشگاه جان هاپکینز صورت گرفت، مشخص گردید که تجویز 50 میکروگرم LT از راه پوست در ناحیه بالای بازو در روزهای 0، 21، 42 می تواند موجب بالا رفتن آنتی بادی سیستمیک و آنتی بادی مخاطی در روده شود، (87). این نتایج نشان می دهد که ایمنی علیه LT می تواند در محافظت علیه ETEC نقش مؤثری داشته باشد و بایستی در تهیه واکسن مورد توجه قرار گیرد. اگر ایمنی علیه این

اجزای CF مانند CS3 و CS6 می توانند یک ایمنوژن مناسب علیه تمامی سویه ها باشند. آنتی ژن های O و H نیز در ایجاد محافظت علیه ETEC می توانند نقش داشته باشند، اما به دلیل تعداد بالا و تغییرات زیاد کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نمی باشند، (۴۹،۷۱). بر اساس یافته ها و مطالعات بر روی آنتی ژن ها، محققان روش های مختلفی برای تهیه و توسعه واکسن ETEC انتخاب کرده اند. این تحقیقات را می توان در شش گروه زیر طبقه بندی کرد. (جدول شماره 1)

واکسن های طراحی شده بر اساس توکسین

پس از کلونیزاسیون باکتری در روده کوچک، باکتری انتروتوکسین های LT و/یا ST را تولید می کند. این عمل موجب آزادسازی مایعات در روده و ایجاد اسهال می گردد. توکسین ST یک پپتید با وزن ملکولی کم و غیرایمنوژن است. توکسین LT نیز یک پروتئین الیگومر است که از لحاظ ساختاری و آنتی ژنی بسیار شبیه توکسین کلراست، (73). طبق مطالعات انجام شده روی خرگوش، واکسنی که سیستم ایمنی را علیه توکسین و باکتری تحریک کند قادر به ایجاد ایمنی محافظتی مناسبی علیه باکتری خواهد بود. (74)

واکسن سلول کامل کلرا/ زیر واحد B

شباهت آنتی ژنی بین زیر واحد B توکسین کلرا (CTB) و LTB موجب ایجاد واکسن بر پایه سلول کامل کلرا و CTB شد. بر طبق این شباهت، این واکسن خوراکی ممکن بود باعث ایجاد ایمنی حفاظتی علیه ETEC نیز می شود، (75). LTB غیرتوکسیک همانند CTB به شدت ایمنوژن بوده و در محیط معده-روده پایدار است. هر دو قابلیت اتصال به اپی تلیال روده را داشته و کاندیدای مناسبی برای ایجاد ایمنی علیه LT هستند، اما توکسوئید LT نسبت به CTB در تحریک ایمنی علیه LT مؤثرتر می باشد که به دلیل وجود اپی توپ های منحصر به فرد LTB است. (۷۶،۷۷)

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه در بنگلادش مشخص شد که 67 درصد افراد دریافت کننده این واکسن محافظت بیشتری را نسبت به افراد دریافت کننده سلول کامل (بدون زیر واحد B) نشان

آنتی ژن با ایمنی علیه سایر آنتی ژن های حفاظتی ترکیب شود به طور مؤثرتری از بیماری حاصل از ETEC جلوگیری به عمل می آید، (88)، این نتایج با مطالعه بر روی حیوانات نیز حاصل شد. (89)

تهیه LTB در گیاه

گیاه ترانسژن یک استراتژی نوین برای تهیه واکسن خوراکی است، (90). این روش دارای مزایای

بسیاری است و برای تجویز LTB نیز استفاده شده است. موش هایی که با سیب زمینی های ترانسژن تغذیه شده اند، تیترا آنتی بادی IgG و IgA اختصاصی آنتی ژن در آن ها افزایش یافت، (91). هم چنین، این نتایج در موش هایی که حبوبات ترانسژن دریافت کرده بودند دیده شد. (۹۲،۹۳)

جدول شماره 1. رویکردهای توسعه واکسن علیه ETEC (71)

وضعیت	تکات	طراح و سازنده	ویژگی واکسن
دارای مجوز داک اورال	ایجاد 3-9 ماه محافظت در زنان و کودکان پس از 2 یا 3 دوز خوراکی با فاصله 6 هفته؛ حاوی 1mg زیر واحد B و سلول ویبریو کلرای غیرفعال شده 1011.	ازمایشگاه بیوتکنولوژی سوئد	واکسن های طراحی شده براساس توکسین واکسن سلول کامل کلرا/ زیر واحد B
مطالعات کلینیکی در حال انجام	شواهدی از بهبودی در مطالعات چلنج؛ ممکن است در نوزادان به ایمنی سازی نیاز باشد؛ توانایی استفاده در رژیم Prime-boost: استفاده از 50g هولوتوکسین LT در روزهای 21.0 و 24	شرکت آیومای آمریکا	نوارهای قابل جذب توکسین حساس به حرارت
مطالعات اولیه	دوز خوراکی ایجاد ایمنی علیه LTB می کند؛ مباحث اهمیت توسعه باقی مانده است.	دانشگاه آریزونا، شرکت پرودیزین (prodigene)	تهیه LTB در گیاه
مطالعات بالینی اولیه	کانژوگه با LT یا آنتی ژن دیگر اما نه از طریق روده.	NICHHD	واکسن های بر پایه توکسین های کانژوگه
در حال فرمولاسیون مجدد	ایمن و ایمونوزن؛ 2x10 ¹⁰ هر یک از 5 سویه بیان کننده CFS و نیز 1mg توکسین کلرای #BS2 دوز در 2 هفته؛ حفاظت در تعدادی از مسافران، اما عدم حفاظت در نوزادان مصری.	ازمایشگاه بیوتکنولوژی سوئد دانشگاه گوتنبرگ	واکسن های سلول کامل غیر فعال شده سلول ETEC غیرفعال شده با فرمالین
غیرفعال مطالعات بالینی اولیه	سلول غیرفعال شده با کلیسین در چلنج کمی حفاظت ایجاد می کند. در موش ایمونوزن است.	دانشکده پزشکی بای اور شرکت ویتال پروب/ابرد-سی (Bird-C)	سلول های تیمار شده با کلیسین لیز با واسطه پروتئین E فاز X174
مطالعات بالینی اولیه	لقاء پاسخ های ایمنی علیه آنتی ژن های ETEC بیان شده بوسیله شیگلا فلکسنری؛ مؤثر از طریق استنشاقی، خوراکی و یا ایمنی زایی با TC.	شرکت ویتال پروب/ابرد-سی (Bird-C)	شیگلای غیرفعال شده به عنوان وکتور برای آنتی ژن های ETEC
غیرفعال	دارای خاصیت کمی واکنش زایی، حفاظت قوی.	CVD	واکسن های برپایه ETEC تخفیف حدت یافته
آزمون های بالینی در حال انجام	ایمن و ایمونوزن، عدم ایجاد حفاظت قابل توجه، قبل از تکرار چلنج مدل تغییر داده شود.	CBL	موتانت های واحد CFA/II هولا واکس (HOLA Vax)
آزمون های بالینی در حال انجام	در حیوان ایمونوزن است. تخفیف حدت غیرکارآمد.	CVD	واکسن های هیبرید
در حال بررسی	تخفیف حدت غیرکارآمد.	DoD	هیبرید شیگلای - ETEC تخفیف حدت یافته
مطالعات بالینی اولیه	تحمل خوب، فرمولاسیون جدید شامل CS6، CS3، CFA/II بیان شده در CVD103-HgR.	شرکت برنا بیوتک	هیبرید ویبریو کلرا - ETEC تخفیف حدت یافته
مطالعات بالینی اولیه	آنتی ژن های ETEC بیان شده در Peru-15.	شرکت داروسازی آوانته	هیبرید سالمونلا تیفی - ETEC تخفیف حدت یافته
آزمون های بالینی در حال انجام	ایمن و ایمونوزن برای LTB بیان شده بوسیله واکسن ZH9 تخفیف حدت یافته.	میکروساینس	ساختارهای هیبرید بیان کننده ST
مطالعات بالینی اولیه	پاسخ ایمنی ST خنثی شده به پروتئین الحاقی ST/LTB بیان شده در باکتری تخفیف حدت یافته بطور خوراکی ایجاد می شود؛ ایمنی باقی می ماند تا مورد بررسی قرار بگیرد؛ توانایی توسعه گسترده.	دانشگاه تولن مؤسسه بیوتکنولوژی پکن	
غیرفعال	ایجاد پاسخ ایمنی ضعیف در انسان.	DoD	واکسن های برپایه آنتی ژن های فیمبریه
غیرفعال	LT پاسخ های ایمنی قوی ای علیه خود و CS6 لقاء می کند.	DoD	میکروسفرهای حاوی آنتی ژن های فیمبریه
مطالعات بالینی اولیه	تیترا آنتی بادی عملکردی بالاتری را در موش نسبت به فیمبریه لقاء می کند.	DoD	انتقال CS6 از طریق ایمن سازی عبوری از پوست
مطالعات بالینی اولیه	شروع با DNA و تقویت با واکسن سالمونلا زنده باعث ایجاد پاسخ های ایمنی سینرژیک به CFA/II می شود؛ موش ایمن شده.	مؤسسه علمی بیومدیكال	واکسن بر پایه زیر واحد رأسی فیمبریه
مطالعات بالینی اولیه			رویکرد Prime/boost همراه با DNA واکسن/وکتور

DoD=Department of Defense, CVD=Center for Vaccine Development, CBL=Cambridge Biostability Ltd., NICHHD=National Institute of Child, SBL=Sweden Biotechnology Laboratory

وجود می آورد، (۱۰۴،۱۰۵). برای استفاده از هولوتوکسین، کاهش سمیت انتروتوکسین ضروری است، (106). این مشکل برای بکارگیری ST نیز وجود دارد، اما آزمایشات نشان داده است که بخش اعظم سمیت توکسین از طریق کانژوگاسیون شیمیایی با LT یا سایر آنتی ژن ها کاهش می یابد. (104)

واکسن های سلول کامل غیرفعال شده ایمنی حفاظتی علیه ETEC با مواجهه میزبان با مجموعه آنتی ژنی پیچیده روی سطح باکتری به وجود می آید. از این پدیده می توان برای تهیه واکسن های خوراکی سلول کامل که حاوی سلول های ETEC غیرفعال است استفاده نمود، (۱۰۷،۱۰۸). انواع واکسن های طراحی شده که می توان در این گروه قرار داد شامل موارد زیر است:

سلول ETEC غیرفعال شده با فرمالین یکی از راه های مورد استفاده جهت تهیه واکسن های مخاطی، تهیه باکتری های ETEC کشته شده ای است که مهم ترین CFs ایمونوژن را در سطح خود بیان می کنند، (۱۰۰،۱۰۱). برای این منظور از ETEC کشته شده با فرمالین استفاده شد که آنتی ژن های فیمبریایی 5 سویه ETEC را همراه با CTB نوترکیب (rCTB) در سطح خود بیان می کند. این واکسن بی خطر و ایمونوژن بوده و در دو دوز مورد استفاده قرار گرفت. طبق بررسی های انجام شده، این واکسن باعث ایجاد ایمنی در مسافران شده اما ایمنی قابل ملاحظه ای را در کودکان مصری ایجاد نکرده است. (۱۰۹،۱۱۰)

سلول ETEC غیرفعال شده به روش ژنتیکی سلول های ETEC تیمار شده با کولیسین E2 قادر به رونویسی نیستند. کولیسین یک اندونوکلاز قوی است که توانایی از بین بردن DNA پلاسمیدی و کروموزومی را بدون آسیب رساندن به تمامیت سلول باکتریایی و خاصیت آنتی ژنیسته آن دارد. این رویکرد در مقایسه با سلول هایی که با تیمار شیمیایی یا گرما غیرفعال شده اند متفاوت بوده و سلول های تیمار شده با کولیسین تا حد امکان از نظر ژنتیکی مشابه سلول های زنده هستند، (111). روش دیگر غیرفعال سازی ژنتیکی باکتری های بیماری زای

در مطالعه دیگر موش های که LTB را از طریق خوردن سیب زمینی ترانسژن دریافت کرده بودند، زمانی که با LT مواجه شدند ایمنی محافظتی کاملی را نشان ندادند. تجمع مایعات در روده ایجاد شد اما بسیار کاهش داشت. در موش هایی که واکسن دریافت نکرده بودند (سیب زمینی غیرترانسژن مصرف کرده بودند) هیچ گونه کاهشی در تجمع مایعات دیده نشد. (94)

هم چنین، در افراد داوطلب که سیب زمینی ترانسژن را دریافت کرده بودند پاسخ های ایمنی علیه LTB مشاهده شد. در داوطلبان انسانی که با این واکسن های مشتق از سیب زمینی تغذیه شدند، پاسخ های ایمنی به LTB افزایش پیدا کرد. نتایج مشابهی با واکسن های مشتق از سیب زمینی در موش های ایمن شده با خوردن ذرت های ترانسژن مشاهده شده است. (95)

سلیمیان و همکاران نیز اقدام به تولید پروتئین LTB به صورت الحاق با CfaB (GenBank:FJ744504.1) در گیاه نمودند و توانستند این فیوژن پروتئین را در برگ گیاه تبناکو و دانه کلزا بیان کنند و گروه های مختلف موش را با برگ و دانه گیاه تراریخت تغذیه نمایند. نتایج حاصل از بررسی این موش ها نشان داد که آنتی بادی IgG در سرم موش و IgA در سرم و مدفوع موش علیه فیوژن پروتئین CfaB-LTB تولید شده بود. این موش ها در چالش با باکتری زنده ماندند. (96-98)

واکسن های بر پایه توکسین های کانژوگه LT و ST را می توان در واکسن های کانژوگه مورد استفاده قرار داد. ST به تنهایی و یا همراه با LT در 75 درصد سویه های ETEC یافت می شود، (99). انستیتوی ملی بیماری و سلامت کودکان در آمریکا نیز بیان داشت که میان سویه های مولد ST و میزان رخداد بیماری ارتباط مهمی وجود دارد. (100-103)

توکسین کلرا یا زیر واحد B آن با کپسول پلی ساکاریدی سالمونلاتیفی کانژوگه شد. این واکسن توانست تیترا بالایی از IgG را در موش ایجاد کند، هر چند بررسی بعدی نشان داد که توکسین کامل نسبت به زیر واحد B فعالیت خنثی کننده بالاتری به

ایمنی حفاظتی مؤثری در بین افراد دریافت کننده ایجاد نکرد. (120)

واکسن های هیبرید

هیبرید شیگلا-ETEC تخفیف حدت یافته

هیبرید CVD: سویه تخفیف حدت یافته شیگلا فلکسنری CVD 1204 به عنوان یک پایه تخفیف حدت یافته زنده برای ایجاد این نوع واکسن هیبریدی استفاده می شود. این سویه نوترکیب به نحوی مهندسی شده که CFA/I را به همراه مشتقات موتانت غیرتوکسیک LT بیان می کند. اکثر حیواناتی که با یکی از این ساختارها ایمن شده اند در برابر CFA/I پاسخ های آنتی بادی مخاطی و سیستمی ایجاد می کنند؛ این در حالی است که پاسخ ایجاد شده برای LT کمتر از میزان مورد انتظار است. (۱۲۱،۱۲۲).

هیبرید USDod: سویه شیگلا فلکسنری SC602، آنتی ژن های ETEC را بیان می کند. تلاش های زیادی جهت ایجاد پلاسمیدهای پایدار حامل آنتی ژن های CF صورت گرفت. سپس، پلاسمیدهای تولید شده را به سلول های SC602 وارد کردند. این گروه قادر به بیان فیوژن پروتئین CFA/I-LT و سایر فیوژن ها می باشد. (123)

هیبرید ویبریو کلرا-ETEC تخفیف حدت یافته

در این نوع واکسن از یک سویه خاص ویبریو کلرا استفاده شده و مجموعه ژنی CFA/I را به کروموزوم باکتری ملحق می سازند. این سویه ویبریو دارای حذف نوکلئوتیدی در زیر واحد A توکسین است. (124)

هیبرید سالمونلا تیفی-ETEC تخفیف حدت یافته

ساختارهای واکسنی تخفیف حدت یافته زنده (ZH9) از سویه وحشی سالمونلاتیفی Ty2 به وجود آمده اند. این ساختارها با حذف یک ژن در مسیر بیوسنتز آمینواسیدهای آروماتیک (aroC) و در جزایر بیماری زایی-2 (ssaV) ایجاد شده اند. ZH9 به عنوان سویه پایه برای الحاق ژن های بیان کننده LTB استفاده می شود. کاندیدای واکسنی هیبرید سالمونلا-ETEC، پاسخ های ایمنی مخاطی و سیستمی ضد LT را در موش هایی که به صورت خوراکی ایمن شده اند افزایش می داد. (125)

روده ای، کشتن سلول با واسطه پروتئین E فاز $\phi X174$ است که نتیجه آن به جای ماندن جسم سلولی است. در این فرایند فضای داخلی باکتری عاری از اسیدهای نوکلئیک، ریبوزوم ها و سایر محتویات درون سلولی می شود در حالی که ساختار غشای داخلی و خارجی به صورت دست نخورده باقی می ماند. (۱۱۳،۱۱۲)

شیگلای غیرفعال شده به عنوان ناقل برای آنتی ژن های ETEC

شیگلا غیرفعال شده با فرمالین در انسان و حیوان ایمونوژن بوده و یک روش ایمن برای انتقال آنتی ژن ها به میزبان می باشد. (114). جسم سلولی شیگلا فلکسنری بیان کننده CS3 و CFA/I (CVD1203) در استرالیا تولید و اکنون تحت نظر آزمایشات کلینیکی در USFDA است. تحقیقات صورت گرفته بر روی آن ها نشان می دهد که ارگانسیم غیرفعال شده به صورت خوراکی یا استنشاقی، پاسخ های ایمنی را تحریک می کند. (۱۱۴،۱۱۵)

واکسن های بر پایه ETEC تخفیف حدت یافته

موتانت های واجد CFA/II

ای. کلی E392-75-2a یک موتانت واجد CFA/II است که ژن های LT و ST از پلاسمید آن حذف شده اند. (۱۱۶،۱۱۷). این ارگانسیم می تواند منجر به ایجاد پاسخ هایی ایمنی حفاظتی علیه ETEC تخفیف حدت یافته شود. (118)

ETEC تخفیف حدت یافته

جهت توسعه واکسن ETEC تخفیف حدت یافته (هولاواکس) برنامه ریزی هایی صورت گرفت. در این برنامه سویه E1392-75-2a استفاده شد و 2 یا 3 ژن اختصاصی بدون آن که اثری بر بیان ژن CFA/II ندارد از باکتری حذف گردید. (119). دو آزمون بالینی برای ارزیابی بی خطر بودن و بررسی ایمونوژنیسیته کاندیداهای واکسن صورت پذیرفت. طبق این بررسی ها، این واکسن ها بی خطر بودند اما سویه دارای 3 موتاسیون (PTL-003) پاسخ های ایمنی مخاطی بهتری ایجاد کرد و مدت زمان بیشتری در روده کلونیزه شد. این واکسن، ایمونوژن قوی بود اما

ساختارهای هیبرید بیان کننده *ST*

ساختارهای ژنتیکی بیان کننده *CS3* و توکسین های فیوژن *LTB-ST* به گونه ای دستکاری شده اند که می توانند در شیگلا فلکسنری بیان شوند. آنتی ژن *ST* بیان شده باعث افزایش پاسخ آنتی بادی در موش می شود. این آنتی بادی ها قادر به خنثی کردن فعالیت بیولوژیک *ST* طبیعی هستند. (126)

واکسن های بر پایه آنتی ژن های فیمبریه

مطالعات بر پایه ایمن سازی غیرفعال و بعضی از واکسن های انسانی نشان می دهد که فاکتورهای کلونیزاسیون *EPEC* قادر به القای ایمنی حفاظتی هستند، (۱۰۸،۱۲۷). آزمون اولیه بر روی مسافران به مناطق اندمیک که واکسن واجد *CFS* و *rCTB* را دریافت کرده بودند، رضایت بخش بود، (19). انواع واکسن های این گروه شامل موارد زیر است:

میکروسفرهای حاوی آنتی ژن های فیمبریه

این واکسن تک ظرفیتی دارای سه فاکتور کلونیزاسیون شایع *CS6*، *CS3*، *CFA/I* است که به شکلی خالص در میکروسفرهایی از جنس پلی لاکتید گلیکولید (*PLGA*) جای گرفته اند و از طریق خوراکی تجویز می شوند. مطالعات انجام شده بر روی این سیستم ها ثابت کرد که میکروسفرهای با اندازه های مشخص قابلیت جذب دارند و پردازش آن ها در پلاک های پی یر پاسخ های ایمنی موضعی و سیستمی را تحریک می کند. اولین مطالعه انسانی بر روی آن ها در دانشگاه مریلند انجام شد که پاسخ های ایمنی ضعیفی را در انسان ایجاد کرد، (128). یکی دیگر از واکسن هایی که به این روش تهیه شد میکروکپسول حاوی *CS6* بود که به صورت استنشاقی بر روی موش مورد بررسی قرار گرفت. این واکسن باعث ایجاد پاسخ های ایمنی شدیدی در موش گردید. (129)

از آن جایی که زیر واحد *B* فاکتور کلونیزاسیون (*CfaB*) باکتری *EPEC* نقش مهمی را در اتصال باکتری به اپی تلیال روده کوچک بازی می کند و نیز از آن جایی که این پروتئین کاندیدای مناسبی برای تهیه واکسن می باشد، احصائی و همکاران ژن *CfaB* را مورد بررسی قرار دادند. آن ها ابتدا ژن *CfaB*

(GenBank:GU355642.1) را درون باکتری ای.کلی همسانه سازی و سپس بیان کردند. پروتئین *CfaB* نو ترکیب تخلیص و تیتر بالای از آنتی بادی *IgG* علیه این پروتئین در موش ایجاد گردید. (130-133)

انتقال CS6 از طریق ایمن سازی از طریق پوست

مطالعات انجام شده بر روی این روش با استفاده از *LT* نشان می دهد که توکسین *LT* باعث ایجاد سمیت سیستمی و موضعی نمی گردد. هم چنین تحریک کننده ترشح آنتی بادی های *IgA* و *IgG* می باشد. مطالعه بر روی حیوانات نشان داد که توکسین *LT* نقش ادجوانی برای آنتی ژن *CS5* بازی می کند. (134)

واکسن بر پایه زیر واحد رأسی فیمبریه

محققان به این نتیجه رسیدند که زیر واحد اتصال دهنده فرعی نسبت به کل فیمبریه به طور مؤثرتری موجب تحریک آنتی بادی های حفاظتی می شود، زیرا اتصال باکتری به روده بیشتر از طریق زیر واحدهای فرعی فیمبریه صورت می پذیرد. زمانی که زیر واحد رأسی نو ترکیب *dscCfaE* همراه با یک ادجوان مخاطی به طریق استنشاقی و گوارشی استفاده می شود، منجر به تحریک تولید آنتی بادی های *IgG* و *IgA* می گردد. (135)

زیر واحد فرعی فاکتور کلونیزاسیون *I (CfaE)*، یکی از زیر واحدهایی است که باعث اتصال باکتری به سطح روده می شود. تولید آنتی بادی علیه این زیر واحد می تواند از اتصال باکتری به اپی تلیال روده و در نتیجه بروز بیماری جلوگیری کند. بنا بر این می تواند به عنوان جزئی از کاندیدای واکسن مورد بررسی قرار گیرد. بر این اساس سلیمیان و همکاران ژن *CfaE* (GenBank:GU355643.1) را در وکتور *pET28a* همسانه سازی کردند و در باکتری ای.کلی بیان نمودند. این پروتئین برای بررسی تولید آنتی بادی به تعدادی موش تزریق و تیتر بالای از آنتی بادی *IgG* علیه این پروتئین تولید گردید. (۱۳۶،۱۳۷)

رویکرد *Prime/boost* همراه با *DNA* واکسن/وکتور

در این رویکرد، وکتور *DNA* بی و واکسن سالمونلای نو ترکیب زنده و بیان کننده آنتی ژن

فیمبریه CFA/I به صورت هم افزایی موجب تحریک پاسخ های ایمنی علیه آنتی ژن فیمبریه می شوند. (۱۳۸،۱۳۹)

بحث و نتیجه گیری

عامل مهم اسهال ناشی از ETEC در کشورهای در حال توسعه فقر بهداشتی و عدم وجود آب آشامیدنی تمیز است. استراتژی های محافظتی مختلفی برای کنترل عفونت وجود دارد اما یافتن راه حل مناسب چندان آسان نیست. از جمله این استراتژی ها؛ بهبود بهداشت و توسعه واکسن های مؤثر علیه ETEC می باشد. دسترسی به آب تمیز، بهداشت مناسب، تغذیه کافی و توسعه اصول بهداشتی به طور قطع در طولانی مدت بزرگ ترین اثر را روی بیماری های اسهالی می گذارد. انجام این اقدامات در اغلب کشورهای در حال توسعه مشکل است، بنا بر این پیشگیری از این بیماری به نظر می رسد بهترین راه ممکن باشد. واکسیناسیون علیه عفونت های روده ای موجب کاهش تعداد افراد مبتلا در جمعیت می شود که از این طریق می توان انتقال عامل بیماری زا را در آن جمعیت کاهش داد.

با توجه به این که اسهال ناشی از ETEC در کودکان با افزایش سن کاهش می یابد و از طرفی این پدیده در مسافران که مدت زمان زیادی را در مناطق اندمیک به سر می برند نیز مشاهده می شود لذا به نظر می رسد پاسخ ایمنی به شکل طبیعی در این افراد به وجود می آید. بنا بر این می توان نتیجه گرفت که تولید یک واکسن ایمن و مؤثر علیه ETEC امکان پذیر است.

بهره برداری از فاکتورهای ویروالانس کشف شده، همراه با اطلاعات موجود از ژنوم ETEC و ابزارهای مورد استفاده برای کشف آنتی ژن های پیش بینی شده، فرصت بی نظیری برای بررسی چالش های توسعه یک واکسن محافظتی برای پاتوژن های روده ای است، واکسنی که بتواند به طور گسترده در همه جا مورد استفاده قرار گیرد.

جهت طراحی واکسن از مولکول(های) کاندیدای واکسنی استفاده می شود که علاوه بر خاصیت

ایمنی زایی و بی خطر بودن، شیوع زیادی بین انواع سویه ها داشته و در عین حال واجد اپی توپ های محافظت شده و مشترک باشند. به نظر می رسد چنین واکسنی باید حاوی آنتی ژن های فیمبریایی شایع مانند فاکتور کلونیزاسیون I و CS1-CS6 و/ یا یک توکسوئید LT باکتری باشد.

یکی دیگر از چالش های مهمی که در طراحی و تولید واکسن مورد توجه محققان قرار دارد مسیر ورود کاندیدای واکسن به بدن است. با توجه به محل ورود، استقرار، تکثیر و بیماری زایی باکتری به نظر می رسد ایجاد محافظت در سطوح مخاطی و تولید آنتی بادی IGA و مهار کلونیزاسیون باکتری و خشی سازی توکسین های آن از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد و محققان رویکردهای متفاوتی مانند تهیه واکسن خوراکی، تجویز از راه دهان، تجویز تنفسی و پوستی نسبت به این مسأله مهم دارند.

از طرف دیگر، دلایلی وجود دارد مبنی بر این که میزان ایجاد ایمنی سویه های واکسن در بین افراد کشورهای در حال توسعه کمتر از افراد کشورهای توسعه یافته است. از جمله این دلایل؛ وجود عفونت های روده ای با سایر میکروب ها و یا تغذیه نامناسب جمعیت نوزادان می باشد. بنا بر این کارایی واکسن باید در کشورهای در حال توسعه آسیا و آفریقا که شیوع بالایی از عفونت های روده ای دارند ارزیابی شود. کاندیدای واکسن بایستی توانایی مقابله با سروتیپ های مختلف باکتریایی موجود در مناطق مختلف جغرافیایی را داشته باشد.

اگر چه پیشرفت های قابل توجهی در زمینه واکسن های روده ای صورت گرفته است، اما هنوز مباحث مهم و چالش های نیز وجود دارد که بایستی مورد بررسی قرار گیرد. با وجود تمامی این چالش ها، WHO، مراکز تحقیقاتی مانند انستیتوی سلامت و دانشگاه مریلند، همراه با انستیتوی واکسن کره، برنامه های فعال زیادی را برای تهیه واکسن علیه عفونت های روده ای در کشورهای در حال توسعه مورد هدف قرار داده اند. WHO نقطه نظرات و استراتژی هایی برای تهیه واکسن علیه ETEC منتشر

کرده است. این خواسته ها، ایده آل ها و انتظارات به عنوان راهنمای تهیه واکسن در جدول شماره 2 ذکر شده است.

جدول شماره 2. ویژگی های یک واکسن مؤثر علیه ETEC (71)

توصیف هدف	اساس هدف	حداقل قابل قبول
جمعیت (ها) هدف	جلوگیری از بیماری از سن 6 ماهگی در نوزادان	شروع حفاظت در 6 ماهگی؛ ایجاد حفاظت در کودکان چندان مشخص نیست
شاخص (ها)	ایجاد محافظت در اکثر جمعیت هدف، آماده عرضه به بازار ETEC عامل اصلی اسهال دوران کودکی در کشورهای در حال توسعه است	محافظت علیه اسهال شدید ایجاد شده با انواع واکسن
فرمولاسیون، مسیر، برنامه	برای حمل و نقل مناسب است و برنامه مورد استفاده در کشورهای درحال توسعه است.	3 دوز زیر 6 ماهگی؛ بوستر در 9 ماهگی؛ ذخیره در 2-8 درجه سانتیگراد؛ لیوفیلیزه شده
اثربخشی مورد انتظار	ابتداء حداقل و اغلب حفظ کننده و نجات دهنده زندگی	50 درصد محافظت علیه بیماری شدید حاصل از ETEC در کشورهای توسعه یافته طی 2 سال اول زندگی
ذخیره سازی	جنبه های عملکردی؛ انتقال به استفاده کنندگان نهایی	4-8 درجه سانتیگراد
زمان مجاز نگهداری	انعطاف پذیری در عرضه و توزیع	2 ساله ها
ماهیت و محتویات آن	سهولت در حمل و ذخیره؛ ایمنی شیوه مصرف؛ مایع	چندین دوز؛ لیوفیلیزه شده و قابلیت سوسپانسه کردن مجدد
مصرف کنندگان مورد هدف	احتمالا دارای بازار بزرگ	انجمن ارائه کنندگان واکسن بین المللی
ریسک کنترل	استاندارد بالا؛ حداکثر خرید و فروش	واجد شرایط WHO؛ ارزیابی NRA ؛ مورد قبول GMO
هشدارها و احتیاط های پیشگیرانه/ حاملگی و شیردهی	سهولت مدیریت و اجرا	هیچ نشانه نامناسبی در حاملگی دیده نشود؛ احتیاط در مورد بیماران ایمنی؛

GMO=Genetically Modified Organization, NRA= National Rifle Association, FDA/EMEA= Food and Drug Administration/European Medicines Agency, WHO=World Health Organization

References

- 1-Svennerholm AM, Tobias J. Vaccine against Enterotoxigenic Escherichia coli. Expert Rev Vaccine 2008;7:795-804.
- 2-Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull WHO 2003;81:197-204.
- 3-Huilan S, Zhen LG, athan MM, Mathew MM, Olarte J, pejo R, et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. Bull WHO 1991;69:549-55.
- 4-Hyams KC, Bourgeois AL, Merrell BR, Rozmajzl P, Escamilla J, Thornton SA, et al. Diarrheal disease during Operation Desert Shield. N Engl J Med 1991;325:1423-8.
- 5-Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of Bact coli neapolitanum from summer diarrhoea of infants. J Pathol Bacteriol 1945;57:239-47.
- 6-Taylor J, Wilkins MP, Payne JM. Relation of rabbit gut reaction to enteropathogenic Escherichia coli. Br J Exp Pathol 1961;42:43-52.
- 7-Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR, et al. Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet I 1978;1119-22.
- 8-Gorbach SL, Banwell JG, Chatterjee BD, Jacobs B, Sack RB. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal micrflora. J Clin Investig 1971; 50:881-9.
- 9-Sack RB. Proceedings of the 4th Joint Conference, Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, Unzen, Japan, 1968; 23-5.
- 10-DuPont HL, Formal SB, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Sheahan DG, et al. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. N Engl J Med 1971;285:1-9.
- 11-Levine MM, Nalin DR, Hoover DL, Bergquist EJ, Hornick RB, Young CR. Immunity to enterotoxigenic Escherichia coli. Infect Immun 1979;23:729-36.
- 12-Evans DJ, Evans DG. Three characteristics associated with enterotoxigenic

- Escherichia coli isolated from man. *Infect Immun* 1973;8:322-8.
- 13-Merson MH, Sack RB, Islam S, Saklayen G, Huda N, Huq I, et al. Disease due to enterotoxigenic Escherichia coli in Bangladeshi adults: clinical aspects and a controlled trial of tetracycline. *J Infect Dis* 1980;141:702-11.
- 14-Nalin DR, JC McLaughlin, M Rahaman, M Yunus, G Curlin. Enterotoxigenic Escherichia coli and idiopathic diarrhoea in Bangladesh. *Lancet* ii 1975;1116-9.
- 15-Ryder RW, Sack DA, Kapikian AZ, McLaughlin JC, Chakraborty J, Mizanur Rahman AS, et al. Enterotoxigenic Escherichia coli and Reovirus-like agent in rural Bangladesh. *Lancet* i 1976;659-63.
- 16-Black RE, Lopez de Romana G, Brown KH, Bravo N, Bazalar OG, Kanashiro HC. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huascar, Peru. *Am J Epidemiol* 1989;129:785-99.
- 17-Black RE, Merson MH, Huq I, Alim AR, Yunus M. Incidence and severity of rotavirus and Escherichia coli diarrhoea in rural Bangladesh. Implications for vaccine development. *Lancet* i 1981;141-3.
- 18-Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, Bradley Sack R. Enterotoxigenic Escherichia coli in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:465-83.
- 19-Wenneras C, Erling V. Prevalence of enterotoxigenic Escherichia coli-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. *J Health Popul Nutr* 2004;22:370-82.
- 20-Qadri F, Saha A, Ahmed T, Al Tarique A, Begum YA, Svennerholm AM. Disease burden due to enterotoxigenic Escherichia coli in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect Immun* 2007;75:3961-8.
- 21-Qadri F, Das SK, Faruque AS, Fuchs GJ, Albert MJ, Sack RB, et al. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. *Clin Microbiol* 2000;38:27-31.
- 22-Svennerholm AM, Steele AD. Progress in enteric vaccine development. Best practice and Res Clin Gastroenterol 2004;18:421-54.
- 23-Nicklasson M. Studies on the Expression and Regulation of Enterotoxins and Colonization Factors in Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Institute of Biomedicine Department of Microbiology and Immunology Göteborg University, Printed at Vasastadens Bokbinderi AB, Göteborg, Sweden, 2008.
- 24-Svennerholm AM, Tobias J. Vaccine against Enterotoxigenic Escherichia coli. *Expert Rev Vaccine* 2008;7:795-804.
- 25-Gaastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). *Trends Microbiol* 1996;4:444-52.
- 26-RB Sack, SL Gorbach, JG Banwell, B Jacobs, BD Chatterjee, RC Mitra. Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from patients with severe cholera-like disease. *J Infect Dis* 1971;123:378e385.
- 27-Yoder JS, Cesario S, Plotkin V, Ma X, Kelly-Shannon K, Dworkin MS. Outbreak of enterotoxigenic Escherichia coli infection with an unusually long duration of illness. *Clin Infect Dis*.2006;42:1513e1517.
- 28-Finkelstein RA, Vasil ML, Jones JR, Anderson RA, Barnard T. Clinical cholera caused by enterotoxigenic Escherichia coli. *J Clin Microbiol* 1976;3:382e384.
- 29-Chena JC, Hob TY, Changa YS, Wu SL, Hsiang CY. Anti-diarrheal effect of Galla Chinensis on the Escherichia coli heat-labile enterotoxin and ganglioside interaction. *J Ethnopharmacol* 2006;103:385-91.
- 30-DeBoy JM, Wachsmuth IK, Davis BR. Antibiotic resistance in Enterotoxigenic and non-enterotoxigenic Escherichia coli. *J Clin Microbiol* 1980;12:264-70.
- 31-Vu Nguyen T, Van Le P, Huy Le C, Weintraub A. Antibiotic Resistance in Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella Strains Isolated from Children in Hanoi, Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:816-9.
- 32-Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Travelling with infants and young children. Part III: Travellers diarrhoea. *J Travel Med* 2002;9:141-50.
- 33-World Health Organization report. State of the art of vaccine research and development., [cited 2005]. Available from: <http://www.who.int/vaccines-documents/>.
- 34-Qadri F, Saha A, Ahmed T, Tarique A, Begum Y, Svennerholm AM. Disease burden due to enterotoxigenic Escherichia

- coli(ETEC) in the first two years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect. Immune* 2007;75:3961-8.
- 35-Tribble D, Taylor D. ETEC and enteric vaccines Traveler's vaccines. BC Decker, London UK 2004;275-97.
- 36-Ahren CM, Svennerholm AM. Experimental enterotoxin-induced Escherichia coli diarrhea and protection induced by previous infection with bacteria of the same adhesin or enterotoxin type. *Infect. Immun* 1985;50:255-61.
- 37-Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with Enterotoxins for the Generation of Secretory Immunity or Tolerance: Applications for Oral Infections. *J Dent Res* 2005;84:1104-16.
- 38-Weekly Epidemiological Record. Enterotoxigenic Escherichia coli: advances in technical and laboratory aspects of research and development of vaccines. 2008.
- 39-World Health Organization Geneva. Weekly epidemiological record. Printed in Switzerland 2006;81:97-104.
- 40-Sooka A, Plessis M, Keddy K. Enterovirulent Escherichia coli. *South African J Epidemiol Infect* 2004;19:23-33.
- 41-Sack RB. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli *Microbiol* 1975;29:333-53.
- 42-Sizemore DR, Roland KL, Ryan US. Enterotoxigenic Escherichia coli virulence factors and vaccine approaches. *Expert Rev Vaccines* 2004;3:585-95.
- 43-Gill DM, Richardson SH. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of Escherichia coli: comparison with cholera toxin. *Infect Dis* 1980;141:64-70.
- 44-Holmgren J. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature* 1981;292:413-7.
- 45-Rao MC. Toxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. *Ciba Found Symp* 1985;112:74-93.
- 46-Eric AB, Hardwidge PR. Biochemical characterization of the enterotoxigenic Escherichia coli *LeoA* protein. *Microbiol* 2007;153:3776-84.
- 47-Turner SM, Chaudhuri RR, Jiang ZD, DuPont H, Gyles C, Penn CW, et al. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic Escherichia coli strains of different evolutionary lineages. *J Clin Microbiol* 2006;44:4528-36.
- 48-Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli: identification and characterization. *J Infect Dis* 1980;142:279-86.
- 49-Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and Hserogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic Escherichia coli *Clin Microbiol Rev* 1997;10:569-84.
- 50-Walker RI. Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. *Vaccine* 2005;23:69-85.
- 51-Celia C, Carlos MD, Mediadora C, Saniel MD. Etiology and Epidemiology of Diarrhea. *Microbiol Infect Dis* 1990;19:51-3.
- 52-Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, Wartna ES, van Zanten BA, Witholt B, et al. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from E. coli. *Nature* 1991;351:371e377.
- 53-Merritt EA, Pronk SE, Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Hol WG. Structure of partially-activated E. coli heat-labile enterotoxin (LT) at 2.6 Å resolution. *FEBS Lett* 1994;337:88e92.
- 54-Wandersman C. Secretion across the bacterial outer membrane. in: F. Neidhardt (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Am Soc Microbiol 1996;955e966.
- 55-Hirst T, Holmgren J. Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7418e7422.
- 56-Tauschek M, Gorrell RJ, Strugnell RA, Robins-Browne RM. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7066e7071.
- 57-Lencer WI, Hirst TR, Holmes RK. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:177e190.
- 58-Johnson AM, Kaushik RS, Francis DH, Fleckenstein JM, Hardwidge PR. Heat-labile enterotoxin promotes Escherichia coli adherence to intestinal epithelial cells. *J Bacteriol* 2009;191:178e186.

- 59-Allen KP, Randolph MM, Fleckenstein JM. Importance of heatlabile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 2006;74: 869e875.
- 60-Sears JBK CL. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996;60: 167-215.
- 61-Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect* 2010;12:89-98.
- 62-Tsai SC, Noda M, Adamik R, Moss J, Vaughan M. Enhancement of cholera ADP-ribosyltransferase activities by guanyl nucleotides and a 19-kDa membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 5139e5142.
- 63-Schulz CKG S, Yuen PS, Garbers DL. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell Host Microbe* 1990;63: 941-8.
- 64-Rudin A, MM McConnell, AM Svennerholm. Monoclonal antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor antigen I (CFA/I) that cross-react immunologically with heterologous CFAs. *Infect Immun* 1994;62:4339-46.
- 65-Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *Embo J* 1994;13:1065e1072.
- 66-Lortie LA, Dubreuil JD, Harel J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1991;29:656e659.
- 67-Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E.coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3093e3097.
- 68-McVeigh A, Fasano A, Scott DA, Jelicic S, Moseley SL, Robertson DC, et al. An *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect Immun* 2000; 68:5710e5715.
- 69-Yamamoto T, Echeverria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun* 1996;64: 1441e1445.
- 70-Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis* 1996; 173:1019e1022.
- 71-Walker RI, Steele D, Aguado T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. *Vaccine* 2007;25:2545-66.
- 72-WHO Meeting Report: Future directions for research on ETEC vaccines for developing countries. *Week Epidemiol Rec* 2006;81:97-104.
- 73-Field M. Modes of action of enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* 1979;1:918-26.
- 74-Ahren CM, Svennerholm AM. Synergistic protective effect of antibodies against *Escherichia coli* enterotoxin and colonization factor antigens. *Infect Immun* 1982; 38:74-9.
- 75-Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Neogy PK, Stanton B, et al. Cross-protection by B subunit-whole cell cholera vaccine against diarrhea associated with heat-labile toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: results of a large-scale field trial. *J Infect Dis* 1988;158:372-7.
- 76-Katz DE, DeLorimier AJ, Wolf MK, Hall ER, Cassels FJ, van Hamont JE, et al. Oral immunization of adult volunteers with microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS6 antigen. *Vaccine* 2003;17:341-6.
- 77-Glenn GM, Francis DH, Danielsen EM. Toxin-mediated effects on the innate mucosal defenses: implications for enteric vaccines. *Infect Immun* 2009;77:5206-15.
- 78-Peltola H, Siitonen A, Kyronseppä H, Simula I, Mattila L, Oksanen P, et al. Prevention of travelers diarrhea by oral B-subunit/whole cell vaccine. *Lancet* 1991; 338:1285-9.
- 79-Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Ehsani Z, Mansori M, Moazeni SM, et al. Cloning and expression of *Escherichia coli*

- heat-labile toxin gene as a vaccine candidate. *Kowsar J* 2009;14:95-100.
- 80-Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Ehsani Z, Mansori M, Moazeni SM, et al. Cloning, expression and purification of *Escherichia coli* heat-labile B subunit as a component of vaccine candidate. *J Iran chem soci* 2009;6 suppl:184.
- 81-Khalesi R, Nazarian S, Ehsaei, Mansouri M, Amani J, Salimian J, et al. Optimization of gene expression and purification of enterotoxigenic *Escherichia coli* recombinant LT_B protein and antibody production against it. *Kowsar J* 2010;15:141-7.
- 82-Khalesi R, Nazarian S, Mansouri M, Amani J, Salimian J, Moazzeni SM. Cloning, expression, purification and antibody production against LT_B protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iran J immunol* 2010;7 suppl 1:91.
- 83-Khalesi R, Nazarian S, Amani J, Salimian J, Moazzeni SM. *Escherichia coli* heat-labile B subunit: expression, purification and antibody production. 18th Iranian congress on infectious disease and tropical medicine. 12-16 Dec 2009. Tehran. Iran.
- 84-Ahangarzadeh Rezaee M, Rezaee A, Moazzeni SM, Salmanian AH, Yasuda Y, Tochikubo K, et al. expression of *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin B Subunit (LT_B) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol* 2005;43:354-60.
- 85-Khalesi R, Salimian J, Nazarian S, Ehsaei Z, Rahimi AA, Moazzeni SM. Production and Purification of Heat-labile Toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and its detection by GM1 Ganglioside receptor-ELISA Based Method. *AMUJ*. in press 2011.
- 86-Salimian J, Salmanian AH, Khalesi R, Mohseni M, Moazzeni SM. Antibody against recombinant heat labile enterotoxin B subunit (rLT_B) could block LT binding to ganglioside M1 receptor. *IJM* 2010;2:120-7.
- 87-McKenzie R, Bourgeois AL, Frech SA, Flyer DC, Bloom A, Kazempour K. Transcutaneous immunization with LT followed by challenge with virulent ETEC. In: 40th Conference of the U.S. Japan Combined Panel on Cholera and Related Bacterial Enteric Infections. 2005.
- 88-Allen KP, Randolph MM, Fleckenstein JM. Importance of heatlabile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 2006;74:869-75.
- 89-Zhang W, Berberov EM, Freeling J, He DE, Moxley RA, Francis DH. Significance of heat-labile enterotoxin in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infect Immun* 2006;74:3107-14.
- 90-Tacket CO. Plant-derived vaccines against diarrhoeal diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:719-28.
- 91-Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 1995;268:714-6.
- 92-Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JM, Brooks CA, Barker DK, Turner DD, et al. Delivery of subunit vaccines in maize seed. *J Control Release* 2002;85:169-80.
- 93-Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA, Streatfield S. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine* 2004;22:4385-9.
- 94-Mason HS, HaqTA, Clements JD, Arntzen CJ. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 1998;16:1336-43.
- 95-Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 1998;4:607-9.
- 96-Salimian J, Moazzeni SM, Salmanian AH. Expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* fusion protein, CfaB-LT_B in transgenic plant as edible vaccine. *J Iran chem soci* 2009;6 suppl:164.
- 97-Salimian J, Moazzeni SM, Salmanian AH. Expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* fusion protein, CfaB-LT_B in transgenic Tobacco and evaluation its immunohenicity. 18th Iranian congress on infectious disease and tropical medicine. 12-16 Dec 2009. Tehran. Iran.
- 98-Salimian J, Moazzeni SM, Salmanian AH. Expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* fusion protein, CfaB-LT_B in transgenic colza seeds and evaluation its immunological property. *Iran J immunol* 2010;7 suppl 1:200.
- 99-Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colo-

- nization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:569-84.
- 100-Cravioto A, Reyes RE, Ortega R, Fernandez G, Hernandez R, Lopez D. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiol Infect* 1988;101:123-34.
- 101-Dean AG, Ching YC, Williams RG, Harden LB. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J Infect Dis* 1972;125:407-11.
- 102-Gomes TA, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SR, Trabulsi LR, Viera MA, et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1991;164:4195-8.
- 103-Zaki AM, DuPont HL, el Alamy MA, Arafat RR, Amin D, Awad MM, et al. The detection of enteropathogens in acute diarrhea in a family cohort population in rural Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1980;35:1013-22.
- 104-Szu SC, Li X, Schneerson R, Vickers JH, Bryla D, Robbins JB. Comparative immunogenicities of Vi polysaccharide-protein conjugates composed of cholera toxin or its B subunit as a carrier bound to higher lower-molecular weight Vi. *Infect Immun* 1989;57:3823-7.
- 105-Szu SC, Taylor DN, Trofa AC, Clements JD, Shiloach J, Sadoff J, et al. Laboratory and preliminary clinical characterization of Vi capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Infect Immun* 1994;62:4440-4.
- 106-Dickinson BL, Clements JD. Dissociation of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun*. 1995;63:1617-32.
- 107-Evans DJ, Evans DG, Opekun AR, Graham DY. Immunoprotective oral whole cell vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea prepared by destruction of chromosomal and plasmid DNA with colicin E2. *FEMS Microbiol Immunol* 1988;47:9-18.
- 108-Evans DG, Evans DJ, Opekun AR, Graham DY. Non-replicating oral whole cell vaccine protective against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhea: Stimulation of anti-CFA (CFA/I) and antienterotoxin (anti-LT) intestinal IgA and protection against challenge with ETEC belonging to heterologous serotypes. *FEMS Microbiol Immunol* 1988;47:117-26.
- 109-Svennerholm AM, Steele AD. Progress in enteric vaccine development. *Best Practice Res Clin Gastroenterol* 2004;18:421-45.
- 110-Ahren C, Jertborn M, Svennerholm AM. Intestinal immune responses to an inactivated oral enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine and associated immunoglobulin A responses in blood. *Infect Immun* 1998;66:3311-6.
- 111-Evans DG, Evans DJ, Opekun AR, Graham DY. Non-replicating oral whole cell vaccine protective against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhea: Stimulation of anti-CFA (CFA/I) and antienterotoxin (anti-LT) intestinal IgA and protection against challenge with ETEC belonging to heterologous serotypes. *FEMS Microbiol Immunol* 1988;47:117-26.
- 112-Lubitz W, Witte A, Eko FO, Kamal M, Jechlinger W, Brand E, et al. Extended recombinant bacterial ghost system. *J Biotechnol* 1999;73:261-73.
- 113-Jalava K, Eko FO, Reidmann E, Lubitz W. Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for mucosal antigen delivery. *Expert Rev Vaccines* 2003;2:89-95.
- 114-Osorio M, Bray MD, Walker RI. Vaccine potential for inactivated shigellae. *Vaccine* 2007;25:1581-92.
- 115-Noriega FR, Losonsky G, Wang JY, Formal SB, Levine MM. Further characterization of delta aroA delta virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203 as a mucosal *Shigella* vaccine and as a live-vector vaccine for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1996;64:23-7.
- 116-Levine MM. Modern vaccines. Enteric infections. *Lancet* 1990;335:958-61.
- 117-Levine MM. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. In: Woodrow GC, Levine MM, editors. *New generation vaccines*. NY: Marcel Dekker, Inc. 1990;649-60.
- 118-Tacket CO, Levine MM. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. II Live oral vaccines and subunit (purified fimbriae and toxin subunit) vaccines. In: Levine MM, Woodrow GC, Ka-

- per JB, Cobon GS, editors. New generation vaccines. 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, Inc. 1997;875-83.
- 119-Turner AK, Terry TD, Sack DA, Londono-Arcila P, Darsley MJ. Construction and characterization of genetically defined aro omp mutants of enterotoxigenic *Escherichia coli* and preliminary studies of safety and immunogenicity in humans. *Infect Immun* 2001;69:49669-79.
- 120-McKenzie R, Bourgeois AL, Engstrom F, Hall E, Chang HS, Gomes JG, et al. Comparative safety and immunogenicity of two attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine strains in healthy adults. *Infect Immun* 2006;74:994-1000.
- 121-Koprowski H, Levine MM, Anderson RJ, LosonskyG, Pizza M, Barry EM. Attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain CVD1204 expressing colonization factor antigen I and mutant heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2000;68:4884-92.
- 122-Altboum Z, Barry EM, Losonsky G, Galen JE, Levine MM. Attenuated *Shigella flexneri* 2a Delta guaBA strain CVD 1204 expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS2 and CS3 fimbriae as a live mucosal vaccine against *Shigella* and ETEC infection. *Infect Immun* 2001;69:3150-8.
- 123-Ranallo T, Fonseka CP, Cassels F, Srinivasan J, Venkatesan MM. Construction and characterization of bivalent *Shigella flexneri* 2a vaccine strains SC608 (pCFAI) and SC608 (PCFAI/LTB) that expresses antigens from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2005;73:258-67.
- 124-Favre D, Ludi S, Stoffel M, Frey J, HornMP, Dietrich G, et al. Expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors in *Vibrio cholerae*. *Vaccine* 2006;24:4354-68.
- 125-Khan SA, Stratford R, Wu T, Mckelvie N, Bellaby T, Hindle Z, et al. *Salmonella typhi* and *S typhimurium* derivatives harboring deletions in aromatic biosynthesis and *salmonella* pathogenicity island-2 (SPI-2) genes as vaccines and vectors. *Vaccine* 2003;21:538-48.
- 126-Zheng JP, Zhang ZS, Li SQ, Liu XX, Yuan SL, Wang P, et al. Construction of a novel *Shigella* live-vector strain co-expressing CS3 and LTB/STm of enterotoxigenic *E. coli*. *World J Gastroenterol* 2005;11:3411-8.
- 127-Levine MM, Morris JG, Losonsky G, Boedeker EC, Rowe B. Fimbriae (pili) adhesins as vaccines. In: Lark DL, Normark S, Uhin B-E, Wolf-Watz H, editors. FEMS symposium no 31: protein-carbohydrate interactions as biological systems-the molecular biology of microbial pathogenicity. London: Academic Press. 1986;143-5.
- 128-Tacket CO, Reid RH, Boedeker EC, LosonskyG, Nataro JP, Bhagat H, et al. Enteral immunization and challenge of volunteers given enterotoxigenic *E. coli* CFA/II encapsulated in biodegradable microspheres. *Vaccine* 1994;12:1270-4.
- 129-DeLorimier AJ, Byrd W, Hall ER, Vaughan WM, Tang D, Roberts ZJ, et al. Murine antibody response to intranasally administered enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS6. *Vaccine* 2003;21:2548-55.
- 130-Ehsaie Z, Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Mansori M, Moazeni SM, et al. Expression of optimized gene of Enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I major subunit. *MJMS* 2011;13:1-12.
- 131-Ehsaie Z, Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Mansori M, Moazeni SM, et al. cloning and bioinformatic study and expression of Enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I major subunit gene. *Shahrekord Med Sci J* in press 2011.
- 132-Ehsaie Z, Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Mansori M, Moazeni SM, et al. cloning and expression of Enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I major subunit as a component of a vaccine candidate. *Iran J immunol* 2010; 7 suppl 1:200.
- 133-Ehsaie Z, Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Mansori M, Moazeni SM, et al. cloning and expression of Enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I major subunit as a component of a vaccine candidate. *J Iran chem soci* 2009; 6 suppl:184.
- 134-Guerena-Burgueno F, Hall ER, Taylor DN, Cassels FJ, Scott DA, Wolf MK, et al. Safety and immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine administered transcutaneously. *Infect Immun* 2002;70:1874-80.
- 135-Savarino SJ, Poole S, Sincock SA, Mc Veigh A, Lee LH, Akay Y, et al. One step beyond: A new approach for vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. In:

40th Joint Conference on Cholera and other Bacterial Enteric Infections & Bill and Melinda Gates Foundation Symposium on Vaccine Development. 2005.

136-Mansori M, Ehsaie Z, Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Zali M, et al. Codon optimization gene of encoded minor subunit Colonization Factor Antigen I (CFaE) from Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC), recombinant protein expression and antibody production. MJMS in press 2011.

137-Mansori M, Ehsaie Z, Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Zali M, et al. Isolation and molecular identification Enterotoxigenic Escherichia coli and cloning, expr-

ession of rCfaE gene. J Iran chem soci 2009;6 suppl:191.

138-Alves AM, Lasaro MO, Almeida DF, Ferreira LC. Newvaccine strategies against enteroroxigenic Escherichia coli. I:DNA vaccines against the CFA/I fimbrial adhesin. Braz J Med Biol Res 1999;32:223-9.

139-Lasaro MO, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira LCS. Primeboost vaccine regimen confers protective immunity to human-derived enterotoxigenic Escherichia coli. Vaccine 2005;23:2428-36.

140-Lia YF, Pooleb S, Nishioa K, Jangc K, Rasulovab F, McVeighb A. Structure of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic Escherichia coli. PNAS 2009;106:10793-8.

Review of Enterotoxigenic Escherichia coli bacteria vaccines

KhalesiR¹, Salimian J^{2}, Moazeni S.M³, Azizi JalilianF⁴*

(Received: 10 Nov. 2012

Accepted: 16 Feb. 2013)

Abstract

Enterotoxigenic Escherichia coli is the most common bacterial agent producing diarrhea in the world wide. This bacterium includes some virulence factors such as; colonization factors and heat-labile toxin and/ or heat-stable toxin. Enterotoxigenic Escherichia coli attached to the intestinal epithelial cell surface through CFs and causes diarrhea by toxin secretion. Molecular pathogenesis studies demonstrate that there are many prophylactic approaches for this infection. The best possible way is designing and producing efficient vaccine that enabeling to induc protective immunity against the most of bacterial strains. Vaccine candidate

molecule(s) that are used to design a vaccine, in addition to possess immunogenicity and safety; they should be widespread among variety of strains and contain conserved and common epitops. This article pays attention to review some information and results of conducted researches on enterotoxigenic Escherichia coli vaccine and importance of the bacteria and its pathogenesis.

Keywords: enterotoxigenic escherichia coli, pathogenesis, vaccine, virulence factors

1. Dept of Medical genetics, Tariat Modares University, Faculty of medicine, Tehran, Iran

2. Microbiology Research Center, Baghyatollah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Dept of Medical Immunology, Tariat Modares University, Faculty of medicine, Tehran, Iran

4. Dept of Medical Microbiology, Faculty of medicine, Ilam University of medical sciences, Ilam, Iran

*(correspondence author)