



人源产肠毒素大肠杆菌疫苗的研发进展

夏芃芃^{1,2#}, 孟宪臣^{1,2#}, 朱国强^{1,2*}

¹扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

²江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

摘要: 腹泻是全球范围内引起5岁以下幼童死亡的第二大病因, 而产肠毒素大肠杆菌(ETEC)是引起腹泻的最常见病原菌, 其产生的细菌定植因子(CFs)和肠毒素是关键毒力因子。CFs介导细菌黏附宿主小肠上皮细胞并完成定植, 产生热敏肠毒素(LT)和热稳定肠毒素(ST)破坏宿主上皮细胞内的体液平衡, 使体液和电介质过量分泌从而导致腹泻。预防ETEC腹泻的首选方法是使用能激发宿主产生抗黏附素免疫力和抗肠毒素免疫力的疫苗, 阻断ETEC黏附和定植并中和肠毒素。目前一种名为Dukoral[®]的霍乱疫苗因能刺激机体产生抗热敏毒素免疫, 已经被一些国家批准用于短期保护和预防旅行者腹泻。新型试验性ETEC候选疫苗正在研发中, 旨在提供保护期长、反应谱广的抗ETEC感染免疫保护力。本文针对疫苗研发的关键问题和研究现状作一综述, 并对未来的研究作出展望。

关键词: 产肠毒素大肠杆菌(ETEC), 腹泻, 免疫, 疫苗

腹泻是一类影响人类健康的重要疾病, 发展中国家幼童最易受到该类疾病的威胁, 报道称每年约有130万名五岁以下的儿童死于此类疾病^[1]。目前, 腹泻已经成为幼童致死的第二大病因, 仅次于肺炎感染导致的死亡。自19世纪80年代以来, 通过改善食品卫生状况和口服水合剂补液, 腹泻引起的死亡人数已经有所下降, 但仍然缺乏行之有效的预防措施。许多国家正在推广使用一种轮状病毒疫苗, 该疫苗对腹泻的预防有一定的

效果, 但无法有效降低非轮状病毒腹泻的发病, 尤其是细菌性腹泻^[2]。

人源产肠毒素大肠杆菌(ETEC)的感染不仅在幼童中有较高的发病率和死亡率, 而且也是引起游客腹泻的主要原因^[3]。每年约有2.8-4.0亿例ETEC感染发病的报道, 约造成30-50万人死亡^[2]。腹泻主要呈地方性流行, 多发生在一些无法保障安全用水的欠发达国家和地区, 因此, 改善饮用水供应、完善卫生设施也许能为预防ETEC腹泻提

基金项目: 国家自然科学基金(30571374, 30771603, 31072136, 31270171); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(08KJA230002); 科技部转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08006-001B); 省校研究生科研创新计划项目(KYLX_1359)

*通信作者. Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@yzu.edu.cn

收稿日期: 2015-06-10; 修回日期: 2015-09-01; 网络出版日期: 2015-09-11

供很好的解决方案, 而研制并推广适用于公众预防免疫的疫苗也是一种较为实用的减少EPEC对公共健康威胁的有效方法。

1 EPEC的病原特性

人源EPEC是一类可分泌LT和/或STa的大肠杆菌, 大部分菌株还会产生一个或多个CFs。CFs主要是菌毛状或纤丝状的生物多聚纤丝, 每个菌体表面存在数百个这样的重复结构单元。目前, 至少有25种不同的CFs被证明与腹泻相关, 其中7种常见于严重腹泻病例^[4]。这些CFs介导细菌黏附到宿主上皮细胞并定植于小肠, 随后在小肠上皮细胞近端产生和释放LT和STa肠毒素, 刺激体液过量分泌, 引起腹泻。

LT是典型的A:B型全毒素, 包含1个A亚单位和5个B亚单位, 和霍乱弧菌产生的霍乱毒素极其相近。LT-B亚单位可以结合到上皮细胞单唾液酸四己糖神经节苷脂之类的神经节苷脂受体上, 继而释放A亚单位激活腺苷酸环化酶途径, 导致宿主细胞内cAMP水平上升, 激活cAMP依赖的蛋白激酶, 引起氯化物的过量分泌, 同时抑制氯化钠的吸收, 最终导致体液的过量分泌^[5-6]。

仅含19个氨基酸的肠毒素STa通过和宿主肠上皮细胞外膜上的鸟苷酸环化酶C跨膜受体结合, 激活鸟苷酸环化酶途径, 导致细胞内cGMP水平上升。和cAMP水平上升的效应类似, cGMP水平的上升促进了宿主肠上皮细胞氯化物的分泌, 同时抑制了氯化钠的吸收, 从而导致了体液的过量分泌。当体液的分泌量远远超出肠腔的重吸收能力时, 引起水样腹泻, 同时, 由于体液大量丢失可导致脱水和电解质失衡, 若得不到及时的治疗, 严重者可导致急性死亡^[7]。

对EPEC腹泻患者的流行病学调查发现, 呈地方性流行的地区以婴儿和小于3岁的儿童感染最为常见, 且发病率随年龄增长而降低^[8]。而游客的

发病率与在流行地区的滞留时间长短有关, 与年龄变化趋势无关^[9]。这表明人自然接触病原后确实能产生抵抗EPEC感染的免疫力, 这种后天获得的免疫力能够保护人体抵抗感染。

2 霍乱对EPEC疫苗研发的启示

由于EPEC腹泻和霍乱在发病机制上有很多相似之处, 霍乱有效口服疫苗的开发提示其类似的研究方法可应用于EPEC疫苗的研制。大部分霍乱疫苗激发的抗体能限制细菌的定植, 其中Dukoral[®](库赛尔生物制药公司, 荷兰)疫苗还能产生中和毒素的抗体。已获准上市的霍乱疫苗包括全菌灭活疫苗(如Shanchol, 赛诺菲巴斯特公司, 印度), 携带霍乱B亚单位的全菌灭活疫苗(Dukoral[®])和霍乱弧菌减毒活疫苗(如CVD103HgR/Mutacol[®], Berna 生物技术有限公司, 瑞士)。因为霍乱毒素(CT)和EPEC毒素在结构上和免疫学上非常相近, 人们期望抗霍乱毒素的疫苗也能交叉保护EPEC感染。有报道霍乱弧菌B亚单位疫苗(WC/BS)能使机体产生抗EPEC的短效免疫力^[10]。以Dukoral生物制药公司生产的含重组霍乱毒素B亚单位(rBS)疫苗作对照, 利用霍乱WC/BS疫苗对615名到摩洛哥旅行的成年芬兰人进行田间试验, 结果表明, 免疫组对EPEC腹泻有52%的保护力, 对产LT的EPEC腹泻有60%的保护力^[11]。另一项对502名夏季逗留在墨西哥的游客的田间试验证实了霍乱WC/rBS疫苗对EPEC腹泻有50%的保护力^[12]。基于此, Dukoral生物制药公司生产的霍乱疫苗已在一些国家获准上市, 用来预防游客腹泻, 但由于其保护期较短, 该疫苗无法作为有效的公众健康疫苗用以预防儿童EPEC腹泻。

3 EPEC疫苗的研发

3.1 灭活EPEC疫苗的研发

EPEC H10407 (O78: H11, LT⁺ STa⁺ CFA/I⁺)

是早期ETEC口服全菌灭活候选疫苗的亲本菌株。在用安慰剂作对照的双盲研究中, 22个成人受试者口服约 3×10^{10} CFU灭活菌, 当用不同的ETEC菌株攻毒感染后, 可在17人体内检测到抗CFA/I的IgA抗体, 19人体内检测到抗LT的IgA抗体, 而同时获得LT IgA和CFA/I IgA抗体的免疫受试者能抵御TR 50/3 (O63:H⁻, LT⁺STa⁺CFA/I⁺)和O6:H16 (LT⁺STa⁺CFA/II⁺)菌株的攻毒感染。由于CFA/I与CFA/II家族中的CS1同源, 可以推测O6:H16的保护作用可能是抗CFA/I交叉免疫力和抗LT免疫保护的结果。然而, 灭活H10407对免疫原性有差异的CFs介导的多种ETEC菌株感染没有完全的保护力^[13]。因此, 口服灭活全菌仅能诱导机体产生对同源抗原的免疫保护。

3.2 灭活重组疫苗SBL ETEC的研发

随后, 口服灭活重组CTB亚单位ETEC疫苗逐渐成为研究的热点。口服灭活重组CTB亚单位ETEC疫苗(又称为SBL ETEC疫苗)由甲醛灭活的3个ETEC菌株, 即O78:H12[STa⁺CFA/I⁺]、O139:H28[CS1]、O6:H16[STa⁺CS2CS3]和重组rCTB组成。早期研究表明, 所有受试者都可对CFA/I、CFA/II和CT/LT产生较强的特异性免疫应答。健康成人在口服总剂量达 1×10^{11} CFU的灭活菌和1 mg rCTB的混合物后并未表现出任何副作用, 证明了该疫苗的安全性; 而90%的志愿受试者在接种后都能产生抗CFs和LT的抗体, 肯定了该疫苗的免疫原性^[14-15]。由于SBL原始产品只携带CFA/I和CFAII(CS1、CS2和CS3)抗原以及CTB, 因此该产品没有预防其他ETEC菌株引起腹泻的能力。

为了进一步优化SBL ETEC疫苗, 另外2种菌株被添加到该疫苗中, 添加有O25:H42(CS4)和O167:H5(STa⁺CS5)两种菌株的新组分SBL ETEC疫苗被重新命名为SBL 001或E001。同时, 以O6:K15:H16(CS1, SBL106)和OR:K15:H6(CS2/CS3, SBL107)分别替代E001中的O139:H28

和O6:H16后形成的疫苗被命名为SBL 003或E003。这两个产品都含有总剂量为 1×10^{11} CFU(每个菌株 2×10^{10} CFU)的细菌和1 mg的CTB, 产品溶于4 mL磷酸盐缓冲液或150 mL碳酸氢盐缓冲液中后用于临床口服检测, 结果发现, 超过70%的成人在服用单次剂量的疫苗后能够产生抗CTB和抗CFs的免疫应答。E003免疫组在抗CFs免疫应答上比E001免疫组更强, 因此临床上应用主要以E003为主^[16-17]。安全性检测结果显示, 2-12岁的儿童在服用SBL E003后表现出良好的免疫耐受, 90%的免疫儿童能产生可检测水平的抗CTB、CFA/I、CS2和CS4的抗体^[18]。但2岁以下的儿童在第一次免疫后, 31%的免疫组儿童会发生腹泻或呕吐, 而产生抗CFA/I和CS4免疫应答的儿童仅占61%和39%。6个月大的婴儿的临床实验更是由于呕吐这一副作用而不得不终止, 但当接种菌量降至原接种量的1/4或1/2时, 呕吐状况能够得到很大程度的缓解^[19-20]。总体来看, SBL疫苗仅能保护游客抵御与疫苗抗原相符的ETEC引起的腹泻, 但不能降低腹泻的发生率。

由于SBL疫苗未能达到显著减少ETEC地方性流行腹泻的目的, 瑞典哥德堡大学研究小组对SBL ETEC疫苗再次进行了改造: 产品一包含过表达CFA/I的甲醛灭活重组菌和1 mg重组LCTBA(OEV-120)蛋白, 后者替代了CTB; 产品二包含可大量表达CFA/I、CS3、CS5和CS6的不产肠毒素的重组菌和1 mg的重组LCTBA蛋白。两个产品均选用脱毒LT(dm LT, LTR192G/L211A)作为佐剂。改造后疫苗的副作用明显减小, 特别是婴幼儿的呕吐症状明显减轻。动物试验结果显示, 当口服大量的疫苗后, 无论是否有脱毒LT佐剂, 小鼠都会产生较强的抗CFs和LT的免疫应答^[21]。

3.3 减毒活疫苗的研发

除了灭活苗外, 减毒活疫苗也是疫苗研究的热点之一。ETEC减毒活疫苗来源于自然存在的ETEC E1392/75(O6:H16, LT⁺STa⁺CS1/CS3)毒力

缺失突变株。实验表明, E1392/75-2A突变株由于丢失了LT和STa毒力基因而导致毒力减弱。安全性检测结果显示, 当免疫剂量达到 2×10^{10} CFU时, 75%的志愿受试者可对表达同种CFs的LT⁺/STa⁺ ETEC菌株产生免疫保护, 仅有15%的志愿受试者免疫后会出现腹泻, 这说明该弱毒活疫苗仅能对同源的ETEC菌株提供保护, 但仍需要进一步的减毒^[22]。

PTL系列菌株是在E1392/75-2A基础上缺失*aro*基因、热激蛋白基因(*htrA*)或1-2个外膜蛋白(*omp*)基因的系列衍生菌, 即PTL-001 ($\Delta aroC \Delta htrA$), PTL-002 ($\Delta aroC \Delta ompC \Delta ompF$)和PTL-003 ($\Delta ompR \Delta aroC$) 3个缺失株^[23]。小鼠鼻内免疫 10^9 CFU活菌时, 这3种缺失株都能使免疫小鼠产生抗CFA/II的IgG和IgA, 并且可在肺灌洗液中检测到IgA。成人志愿受试者口服免疫结果显示, PTL-002和PTL-003能分别刺激免疫受试者产生90%和55%的抗CFA/II的免疫应答。和PTL-002相比, PTL-003具有更好的免疫耐受力 and 更强的免疫原性, 并且具有在志愿者体内更好的定殖效果^[23-24]。因此, 后续实验以PTL-003作为研究对象。以安慰剂为对照的双盲试验结果显示, PTL-003不能保护ETEC菌株E24377A (O139: H28, LT+STa+CS1/CS3)的感染, 原因在于虽然该菌株含有与疫苗菌株相同的CFs抗原, 但它们的O抗原血清型不同^[25]。这说明, 能够提供全面保护力的疫苗还需要包含附加的抗原, 并且需要通过增加抗原的免疫应答来刺激产生对不同ETEC菌株的广泛保护。

基于此, 人们开始研发一种新型的ETEC减毒活疫苗ACE527, 该疫苗由ACAM2025 (CFA/I, LTB), ACAM2022 (CS5/CS6, LTB)和ACAM2027 (CS1/CS2/CS3, LTB) 3种菌株组成。其中, ACAM2025是在野生株WS-1858B上缺失STa和EAST1后增加LTB改造形成, 其安全性和免疫原性已在成年志愿受试者上得到了证明; ACAM2022

是在WS2773E (O141: H5, LT⁺STa⁺EAST1⁺CS5/CS6)基础上增加LTB, 同时缺失所有毒素基因和细菌性噬菌体后改造而成; 而ACAM2027是缺失WS-3504D (O39:H12, LT⁺STa⁺EAST1⁺CS2/CS3)所有毒素基因后增加PTL-003的CS1亚单位基因的突变株^[26-27]。研究显示, 当接种2倍剂量的ACE527时, 机体无副反应, 并且可在志愿受试者体内检测到抗LTB和CFs (CFA/I, CS3和CS6)的抗体。而高剂量(每个菌株 3×10^{10} CFU)接种后虽然可以激发更强的免疫反应, 但是往往会引起一些病人发生呕吐。采用安慰剂作对照的双盲随机法的IIb期研究表明, 用H10407 (LT/Sta, CFAI, O78:H11)对病人进行攻毒前, 免疫ACE527明显减弱了H10407的致病作用: 免疫受试者基本无腹泻现象, 而且在接种后的24 h内, 腹泻的发生数量明显减少, 受试者排泄物中攻毒菌株的浓度也明显减少^[28]。这表明, ACE527很可能作为一种潜在的有效的新疫苗应用于临床。

4 ETEC疫苗载体的研究

如何模拟ETEC活菌在小肠粘膜上的定殖, 寻找到有效的抗原靶向递呈的方法, 从而更有效的诱导免疫应答是ETEC疫苗研究的热点之一。早期研究表明, 用 2×10^{10} CFU能表达ETEC CFA/I亚单位(CfaB)的鼠伤寒沙门氏菌*aroC*缺失株口服免疫小鼠, 并用LT类毒素(LT_{R192G})作为佐剂, 小鼠可产生抗LT和CFA/I的强免疫力, 且免疫小鼠的血清能抑制CFA/I介导的ETEC菌株的黏附。将与免疫小鼠的血清预孵育后的ETEC菌株攻毒新生小鼠, 小鼠不会出现腹泻, 这说明免疫小鼠血清中的抗体具有一定的中和活性^[29]。有报道称, 沙门氏菌减毒活疫苗H683也能作为CFA/I的表达载体, 并能诱导免疫小鼠产生抗CFA/I的强免疫应答, 但免疫后的小鼠仅对腹腔接种的ETEC H10407产生保护。不仅如此, 沙门氏菌活菌同样能表达

毒素抗原并具有一定的免疫原性。当用能表达LTB的沙门氏菌Ty α -TSB7活疫苗株免疫时, 67%的成人志愿受试者产生了抗LT的IgG和IgA抗体^[30]。可惜的是, 目前这些沙门氏菌活疫苗载体仅能装载一个或两个ETEC抗原, 且无法对不同的ETEC菌株产生广泛有效的保护力。

而在多联疫苗研究中可以发现, 减毒的弗氏志贺氏活菌、宋氏志贺氏活菌和痢疾志贺氏活菌均可以用于表达ETEC CFs或LT类毒素抗原。研究表明, 豚鼠在口服这类疫苗时均能产生耐受, 并且可以产生抗CFs或LT抗原的免疫应答, 但相关的保护性检测数据还未有报道^[31]。此外, Walker等利用Peru-15霍乱弧菌活菌疫苗来表达ETEC抗原也获得了成功, 他们发现霍乱弧菌菌株不仅可以表达高水平CTB或CFA/I抗原, 而且可以通过这些抗原刺激机体, 产生抗CFA/I的IgG和IgA抗体以及抗CTB的中和性抗体^[32-33]。但这些疫苗的保护力仍然需要进一步的研究证明。

此外, 在植物上表达ETEC抗原以研制可食用疫苗也备受关注, 原因在于其生产成本低且对多种抗原具有广泛的保护力。研究发现, 在棉花、大米、马铃薯或胡萝卜中表达的LT-B不仅能诱导产生抗LT的IgG和IgA抗体, 而且诱导产生的抗LT抗体具有体外中和CT的活性^[34-35]。但由于转基因的安全性问题, 用基因改良的植物生产细菌性抗原用于免疫预防还存在很大的争议。

5 ETEC感染模型的研究

ETEC候选疫苗的保护效率评估需要合适的动物感染模型, 而理想的模型不仅要有免疫功能正常的小肠, 而且在接种与临床感染相同剂量的病原菌时, 能产生与临床表现类似的症状, 即在腹泻强度和持续时间上都有类似的反应^[36]。目前, 小鼠是普遍用于疫苗安全性和免疫原性研究的动物模型, 但由于其本身不会感染ETEC发生腹泻,

因此并不适用于ETEC疫苗的开发。相反, 兔、仔猪以及灵长类动物(夜猴属, *Aotus*)等不仅对ETEC自然易感, 而且可在感染后产生腹泻, 因此与小鼠相比可能更适用于研究ETEC疫苗。遗憾的是, 尽管灵长类夜猴模型能有效的应用于评价灭活ETEC候选疫苗的保护力, 但由于来源稀少, 成本高等因素, 该种动物作为ETEC疫苗开发模型的应用受到了限制^[37]。

自20世纪80年代以来, 为研究霍乱和ETEC的发病机制, 可逆性肠结扎成年兔腹泻(RITARD)动物模型得到了很好的发展。在RITARD模型中, 当疫苗株与攻毒株同源时, 免疫兔可以得到很好的保护^[36-38]。与兔相似, 猪, 特别是仔猪, 自20世纪70年代以来, 一直作为研究ETEC腹泻的动物模型。猪不仅对ETEC腹泻自然易感, 而且感染后可产生与腹泻患者相同的临床病症。此外, 猪和人在生理和免疫系统上都极为类似, 而猪源和人源ETEC菌株表达的LT和STa肠毒素也高度同源。猪在接种人源ETEC LT或STa肠毒素重组菌株后也会产生腹泻, 因此猪模型也许是评价抗毒素候选疫苗保护效率的最佳模型^[39-40]。然而, 尽管南达荷达州立大学的研究小组已经确定K88ac菌毛介导的ETEC菌株感染和K88ac受体阳性猪的腹泻之间存在生物学相关性, 但由于猪源和人源ETEC表达不同的黏附素, 猪源ETEC的受体通常不能识别人源ETEC表达的CFs^[41-43]。因此, 人源ETEC菌株无法在猪体内高效定殖, 这使猪模型在评价基于抗黏附素免疫的候选疫苗的保护效力上受到了很大程度的制约。

人体感染模型长期以来一直广泛应用于肠道疾病的研究, 且一直是评价ETEC候选疫苗的最佳模型。但事实上, 尽管一些疫苗在临床试验时期效果显著, 但由于个体差异和自然感染带菌量与试验攻毒剂量的差异, 常常会在疫苗推广应用遭遇失败。此外, 受试者本身具有的免疫力同样

也是导致疫苗保护力检测和实际临床应用结果产生较大差异的一个重要因素。因此,我们必须认识到,在评估ETEC候选疫苗时,用于评价抗原安全性和免疫原性的受试志愿者的研究和用于评价保护效力的临床试验之间有很大的不同。

对志愿受试者的研究能够记录腹泻的临床症状并且能够记录血清和粘膜中的抗体反应,抗原特异性抗体分泌细胞(ASC)、淋巴细胞以及粪便中的抗体都能反映机体的免疫应答情况。在发病或免疫后进行抗体分析对检测和定量抗体应答反应是非常有价值的。然而,一个给定的抗体滴度和(或)抗体应答水平与临床保护之间的关联性还未被证实。在9-35月龄埃及儿童中进行的一项研究显示,血清中抗CFA/I的IgG抗体水平能很好地指示CFA/I ETEC是否得到保护,但这仅限于9-17个月龄儿童,同时抗LT的血清IgG抗体水平未表现出与保护性相关^[44]。因此,保护性免疫反应可能是由不同免疫因子共同发挥作用,为证明最佳的免疫剂量和免疫策略,全身性和粘膜性免疫的评估不能仅依靠单一抗体的测量指标^[44-45]。

人类志愿受试者之间遗传背景的不同也使宿主-病原相互作用变的更为复杂,这也是增加研发ETEC腹泻疫苗复杂性的又一因素。对猪的临床研究数据已经表明,不同遗传背景的个体猪可表达产生不同的受体,这些受体特异性识别ETEC菌毛(或黏附素)。因此,只有能表达特异性受体的猪能被减毒活疫苗菌株定殖,并诱导有保护力的粘膜免疫。人类可能同样对不同CFs具有特异性的遗传性受体,这也许能解释当志愿受试者感染高剂量的ETEC H10407时,其中70%会产生严重的腹泻,而剩余的受试者却没有明显的临床症状^[9]。这说明,一些人可能因缺乏相应的受体而获得对腹泻的自然保护力,这种潜能也是候选疫苗评估的关键影响因素。

6 展望

目前还没有能够对ETEC腹泻产生广泛性保护的疫苗,但对此种疫苗的研发一直是科研工作者的研究重点。制约这项研究获得成功的因素有很多,主要包括:(1)针对不同ETEC菌株表达的异源CFs,如何诱导产生具有广泛保护性的抗黏附素免疫;(2)如何诱导抗STa免疫的产生;(3)如何增加肠内的免疫应答强度和持续时间;(4)如何确定合适的动物模型,在动物攻毒试验中准确评估候选疫苗;(5)如何降低合格疫苗的生产成本;(6)如何在缺少国际标准化的数据收集和分析方法的情况下,进行直接而有效的疫苗开发设计等。

由于仅依靠供应安全饮用水和改善卫生系统不能达到长期预防和有效减少腹泻的目的,因此通过接种疫苗获得对ETEC腹泻的保护力是十分必要的。研究中发现,采用口服全菌疫苗,特别是减毒活疫苗在诱导小肠免疫上比亚单位疫苗更有优势,这可能是由于减毒活疫苗能够在宿主小肠定植并直接靶向递呈诱导宿主的免疫。值得注意的是,免疫原性实验结果显示,志愿受试者对LT抗原比对CFs抗原更加敏感,产生的免疫反应持续时间更长。因此,同时带有CFs抗原与LTB抗原的疫苗可能会增加机体对CFs抗原的吸收并刺激产生更强的免疫反应。随着疫苗研究的不断开展,脱毒LT、LT和STa类毒素融合物、CFs抗原, EtpA和其它外膜分泌性抗原,微胶囊ETEC抗原等疫苗的开发都得到了不同程度的发展^[46-51]。遗憾的是,大多数疫苗的研究都由于免疫原性不佳或是缺乏广泛保护力而停滞不前。

而少数菌株多联疫苗的免疫不仅可以解决疫苗免疫原性不佳或是缺乏广泛保护性的问题,而且可以获得较强的免疫保护力,这些菌株大多可以同时表达几种CFs,来诱导抗CFA/I和抗CS1-CS6的广泛性免疫反应。在增加dmLT后,由

于dmLT的佐剂效应,还能够进一步诱导抗黏附素免疫,并且同样能刺激产生抗LT肠毒素的免疫应答^[48-52]。但是,多联疫苗同时也增加了对疫苗中过量菌体抗原摄入导致的安全性问题的担忧。因为当幼龄接种疫苗者摄入过量的菌体抗原时,往往会胃肠不适或者发生呕吐,甚至由于诱发宿主非特异性免疫反应而阻碍靶关键性毒力因子的特异性免疫应答^[17-19]。

因此,在理想的设计条件下,疫苗应该是一个单一的*E. coli*菌株,该菌株携带包含CFA/I和CS1-CS6在内的多种过表达CFs抗原,或者携带保守性CFs抗原以诱导产生可交叉保护CFA/I和CS1-CS6的抗黏附素免疫,并且还要携带能诱导抗LT和抗STa免疫的LT和STa类毒素融合抗原,最后加入重组的dmLT佐剂,以便提供对ETEC腹泻的广泛性保护^[53]。同时,一个能清晰评估ETEC候选疫苗保护效力的动物感染模型对疫苗的成功开发同样重要。由于目前还缺乏一个完美的动物模型,因此,通过复合使用多种动物模型对候选疫苗进行多方面的评估是一个不错的选择。通过兔RITARD模型评估候选疫苗诱导的抗黏附素免疫保护力和抗LT免疫保护力,再利用仔猪模型评估抗毒素免疫对产LT和STa的ETEC感染的保护效果,这样候选疫苗对ETEC临症前期的保护效力将会得到准确评估。最后通过完善的人体感染模型和检测保护效力的田间试验对疫苗的候选资格进行评定,具有足够大的样本容量并且精心设计的临床扩大试验将有助于开发具备广泛保护力的ETEC疫苗。

致谢

值此论文付梓之际,感谢美国堪萨斯州立大学兽医学院Weiping Zhang和华盛顿大学医学院James Fleckenstein教授的大力支持,并提出了许多宝贵建议,特别是提供了与ETEC疫苗研究密切相关的实验材料。

参考文献

- [1] Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet*, 2010, 375(9730): 1969-1987.
- [2] WHO. Future directions for research on enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries. *Weekly Epidemiological Record*, 2006, 81(11): 97-104.
- [3] Sack DA, Shimko J, Torres O, Bourgeois AL, Francia DS, Gustafsson B, Kärnell A, Nyquist I, Svennerholm AM. Randomised, double-blind, safety and efficacy of a killed oral vaccine for enterotoxigenic *E. coli* diarrhoea of travellers to Guatemala and Mexico. *Vaccine*, 2007, 25(22): 4392-4400.
- [4] Gaastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiology*, 1996, 4(11): 444-452.
- [5] Read LT, Hahn RW, Thompson CC, Bauer DL, Norton EB, Clements JD. Simultaneous exposure to *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins increases fluid secretion and alters cyclic nucleotide and cytokine production by intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 2014, 82(12): 5308-5316.
- [6] Verhelst R, Schroyen M, Buys N, Niewold TA. *E. coli* heat labile toxin (LT) inactivation by specific polyphenols is aggregation dependent. *Veterinary Microbiology*, 2013, 163(3/4): 319-324.
- [7] Crane JK, Wehner MS, Bolen EJ, Sando JJ, Linden J, Guerrant RL, Sears CL. Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) and protein kinase C. *Infection and Immunity*, 1992, 60(12): 5004-5012.
- [8] Qadri F, Das SK, Faruque AS, Fuchs GJ, Albert MJ, Sack RB, Svennerholm AM. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(1): 27-31.
- [9] Harro C, Chakraborty S, Feller A, DeNearing B, Cage A, Ram M, Lundgren A, Svennerholm AM, Bourgeois AL, Walker RI, Sack DA. Refinement of a human challenge model for evaluation of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(10): 1719-1727.

- [10] Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Neogy PK, Stanton B, Huda N, Khan MU, Kay BA, Khan MR, Ansaruzzaman M, Yunus M, Raghava Rao M, Svennerholm AM, Holmgren J. 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. *The Journal of Infectious Diseases*, 1988, 158(2): 372–377.
- [11] Peltola H, Siitonen A, Kataja MJ, Kyrönseppä H, Simula I, Mattila L, Oksanen P, Cadoz M. Prevention of travellers' diarrhoea by oral B-subunit/whole-cell cholera vaccine. *The Lancet*, 1991, 338(8778): 1285–1289.
- [12] Evans DJ, Jr., Evans DG, Opekun AR, Graham DY. Immunoprotective oral whole cell vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea prepared by in situ destruction of chromosomal and plasmid DNA with colicin E2. *FEMS Microbiology Immunology*, 1988, 1(1): 9–18.
- [13] Anantha RP, McVeigh AL, Lee LH, Agnew MK, Cassels FJ, Scott DA, Whittam TS, Savarino SJ. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen i and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2004, 72(12): 7190–7201.
- [14] Åhrén C, Wennerås C, Holmgren J, Svennerholm AM. Intestinal antibody response after oral immunization with a prototype cholera B subunit-colonization factor antigen enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Vaccine*, 1993, 11(9): 929–934.
- [15] Wennerås C, Svennerholm AM, Åhrén C, Czerkinsky C. Antibody-secreting cells in human peripheral blood after oral immunization with an inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Infection and Immunity*, 1992, 60(7): 2605–2611.
- [16] Åhrén C, Jertborn M, Svennerholm AM. Intestinal immune responses to an inactivated oral enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine and associated immunoglobulin A responses in blood. *Infection and Immunity*, 1998, 66(7): 3311–3316.
- [17] Cohen D, Orr N, Haim M, Ashkenazi S, Robin G, Green MS, Ephros M, Sela T, Slepion R, Ashkenazi I, Taylor DN, Svennerholm AM, Eldad A, Shemer J. Safety and immunogenicity of two different lots of the oral, killed enterotoxigenic *Escherichia coli*-cholera toxin B subunit vaccine in Israeli young adults. *Infection and Immunity*, 2000, 68(8): 4492–4497.
- [18] Savarino SJ, Hall ER, Bassily S, Brown FM, Youssef F, Wierzbza TF, Peruski L, El-Masry NA, Safwat M, Rao M, El Mohamady H, Abu-Elyazeed R, Naficy A, Svennerholm AM, Jertborn M, Lee YJ, Clemens JD. Oral, inactivated, whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine: results of the initial evaluation in children. PRIDE Study Group. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999, 179(1): 107–114.
- [19] Qadri F, Ahmed T, Ahmed F, Begum YA, Sack DA, Svennerholm AM. Reduced doses of oral killed enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine is safe and immunogenic in Bangladeshi infants 6–17 months of age: dosing studies in different age groups. *Vaccine*, 2006, 24(10): 1726–1733.
- [20] Savarino SJ, Hall ER, Bassily S, Wierzbza TF, Youssef FG, Peruski LF, Jr., Abu-Elyazeed R, Rao M, Francis WM, El Mohamady H, Safwat M, Naficy AB, Svennerholm AM, Jertborn M, Lee YJ, Clemens JD. Introductory evaluation of an oral, killed whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine in Egyptian infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2002, 21(4): 322–330.
- [21] Norton EB, Lawson LB, Freytag LC, Clements JD. Characterization of a mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin, LT(R192G/L211A), as a safe and effective oral adjuvant. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(4): 546–551.
- [22] Sack RB, Kline RL, Spira WM. Oral immunization of rabbits with enterotoxigenic *Escherichia coli* protects against intrainestinal challenge. *Infection and Immunity*, 1988, 56(2): 387–394.
- [23] Turner AK, Terry TD, Sack DA, Londoño-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. *Infection and Immunity*, 2001, 69(8): 4969–4979.
- [24] McKenzie R, Bourgeois AL, Engstrom F, Hall E, Chang HS, Gomes JG, Kyle JL, Cassels F, Turner AK, Randall R, Darsley M, Lee C, Bedford P, Shimko J, Sack DA. Comparative safety and immunogenicity of two attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine strains in healthy adults. *Infection and Immunity*, 2006, 74(2): 994–1000.

- [25] McKenzie R, Darsley M, Thomas N, Randall R, Carpenter C, Forbes E, Finucane M, Sack RB, Hall E, Bourgeois AL. A double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the efficacy of PTL-003, an attenuated enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) vaccine strain, in protecting against challenge with virulent ETEC. *Vaccine*, 2008, 26(36): 4731–4739.
- [26] Harro C, Sack D, Bourgeois AL, Walker R, DeNearing B, Feller A, Chakraborty S, Buchwaldt C, Darsley MJ. A combination vaccine consisting of three live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* strains expressing a range of colonization factors and heat-labile toxin subunit B is well tolerated and immunogenic in a placebo-controlled double-blind phase I trial in healthy adults. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(12): 2118–2127.
- [27] Turner AK, Stephens JC, Beavis JC, Greenwood J, Gewert C, Randall R, Freeman D, Darsley MJ. Generation and characterization of a live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* combination vaccine expressing six colonization factors and heat-labile toxin subunit B. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(12): 2128–2135.
- [28] Darsley MJ, Chakraborty S, DeNearing B, Sack DA, Feller A, Buchwaldt C, Bourgeois AL, Walker R, Harro CD. The oral, live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine ACE527 reduces the incidence and severity of diarrhea in a human challenge model of diarrheal disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2012, 19(12): 1921–1931.
- [29] Lásaro MO, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Nishimura LS, Guth BEC, Ferreira LCS. Combined vaccine regimen based on parenteral priming with a DNA vaccine and administration of an oral booster consisting of a recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain for immunization against infection with human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6480–6491.
- [30] Yang XH, Thornburg T, Holderness K, Suo ZY, Cao L, Lim T, Avci R, Pascual DW. Serum antibodies protect against intraperitoneal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011: 632396.
- [31] Altboum Z, Levine MM, Galen JE, Barry EM. Genetic characterization and immunogenicity of coli surface antigen 4 from enterotoxigenic *Escherichia coli* when it is expressed in a *Shigella* live-vector strain. *Infection and Immunity*, 2003, 71(3): 1352–1360.
- [32] Roland KL, Cloninger C, Kochi SK, Thomas LJ, Tinge SA, Rouskey C, Killeen KP. Construction and preclinical evaluation of recombinant Peru-15 expressing high levels of the cholera toxin B subunit as a vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, 2007, 25(51): 8574–8584.
- [33] Tobias J, Lebens M, Bölin I, Wiklund G, Svennerholm AM. Construction of non-toxic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* strains expressing high and immunogenic levels of enterotoxigenic *E. coli* colonization factor I fimbriae. *Vaccine*, 2008, 26(6): 743–752.
- [34] Karaman S, Cunnick J, Wang K. Expression of the cholera toxin B subunit (CT-B) in maize seeds and a combined mucosal treatment against cholera and traveler's diarrhea. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(3): 527–537.
- [35] Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, López-Revilla R, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solís ÁG. Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(1): 79–84.
- [36] Spira WM, Sack RB, Froehlich JL. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Infection and Immunity*, 1981, 32(2): 739–747.
- [37] Roberts JA, Kaack MB, Baskin G, Svenson SB. Vaccination with a formalin-killed P-fimbriated *E. coli* whole-cell vaccine prevents renal scarring from pyelonephritis in the non-human primate. *Vaccine*, 1995, 13(1): 11–16.
- [38] Cray WC, Jr., Tokunaga E, Pierce NF. Successful colonization and immunization of adult rabbits by oral inoculation with *Vibrio cholerae* O1. *Infection and Immunity*, 1983, 41(2): 735–741.
- [39] Smith HW, Linggood MA, Microbiol J M. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 1971, 4(4): 467–485.
- [40] Zhang WP, Berberov EM, Freeling J, He D, Moxley RA, Francis DH. Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infection and Immunity*, 2006, 74(6): 3107–3114.

- [41] Erickson AK, Baker DR, Bosworth BT, Casey TA, Benfield DA, Francis DH. Characterization of porcine intestinal receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins. *Infection and Immunity*, 1994, 62(12): 5404–5410.
- [42] Grange PA, Erickson AK, Anderson TJ, Francis DH. Characterization of the carbohydrate moiety of intestinal mucin-type sialoglycoprotein receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 1998, 66(4): 1613–1621.
- [43] Xia PP, Zou YJ, Wang YT, Song YJ, Liu W, Francis DH, Zhu GQ. Receptor for the F4 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(12): 4953–4959.
- [44] Rao MR, Wierzbica TF, Savarino SJ, Abu-Elyazeed R, El-Ghoreb N, Hall ER, Naficy A, Abdel-Messih I, Frenck RW, Jr., Svennerholm AM, Clemens JD. Serologic correlates of protection against enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *The Journal of Infectious Diseases*, 2005, 191(4): 562–570.
- [45] Tobias J, Andersson K, Bialik A, Cohen D. Preexisting antibodies to homologous colonization factors and heat-labile toxin in serum, and the risk to develop enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 60(2): 229–231.
- [46] Gaastra W, Sommerfelt H, van Dijk L, Kusters JG, Svennerholm AM, Grewal HMS. Antigenic variation within the subunit protein of members of the colonization factor antigen I group of fimbrial proteins in human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, 292(1): 43–50.
- [47] Glenn GM, Taylor DN, Li XR, Frankel S, Montemarano A, Alving CR. Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nature Medicine*, 2000, 6(12): 1403–1406.
- [48] Lapa JA, Sincock SA, Ananthkrishnan M, Porter CK, Cassels FJ, Brinkley C, Hall ER, van Hamont J, Gramling JD, Carpenter CM, Baqar S, Tribble DR. Randomized clinical trial assessing the safety and immunogenicity of oral microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* surface antigen 6 with or without heat-labile enterotoxin with mutation uR192G. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008, 15(8): 1222–1228.
- [49] Roy K, Hamilton D, Ostmann MM, Fleckenstein JM. Vaccination with EtpA glycoprotein or flagellin protects against colonization with enterotoxigenic *Escherichia coli* in a murine model. *Vaccine*, 2009, 27(34): 4601–4608.
- [50] Zhang WP, Zhang CX, Francis DH, Fang Y, Knudsen D, Nataro JP, Robertson DC. Genetic fusions of heat-labile (LT) and heat-stable (ST) toxoids of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* elicit neutralizing anti-LT and anti-STa antibodies. *Infection and Immunity*, 2010, 78(1): 316–325.
- [51] Fleckenstein J, Sheikh A, Qadri F. Novel antigens for enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 2014, 13(5): 631–639.
- [52] Ruan XS, Sack DA, Zhang WP. Genetic fusions of a CFA/II/IV MEFA (multi-epitope fusion antigen) and a toxoid fusion of heat-stable toxin (STa) and heat-labile toxin (LT) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) retain broad anti-CFA and antitoxin antigenicity. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121623.
- [53] Lundgren A, Bourgeois L, Carlin N, Clements J, Gustafsson B, Hartford M, Holmgren J, Petzold M, Walker R, Svennerholm AM. Safety and immunogenicity of an improved oral inactivated multivalent enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine administered alone and together with dmLT adjuvant in a double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I study. *Vaccine*, 2014, 32(52): 7077–7084.

Advances in new vaccines against human enterotoxigenic *Escherichia coli*-A review

Pengpeng Xia^{1,2#}, Xianchen Meng^{1,2#}, Guoqiang Zhu^{1,2*}

¹ College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

² Jiangsu co-innovation center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the most common cause of diarrhea, which is a second leading cause of death for the children under five years old from all over the world. The key factors of ETEC contain both colonization factors (CFs) and enterotoxins including heat-labile enterotoxin (LT) and heat-stable enterotoxin (ST). CFs mediated the binding of bacteria to the host intestinal epithelial cells, whereas LT and ST stimulated the over-secretion of body fluids and electrolytes, resulting in the destruction of the host fluid balance and leading diarrhea. The vaccine against CFs and enterotoxins could stimulate the host immune response, blocking ETEC adhesion and neutralizing enterotoxins, which is effective in the prevention of ETEC diarrhea. For the moment, depending on the stimulated immune response against LT, a cholera vaccine called Dukoral[®] has been approved for use in some countries for the short-term protection and prevention of travelers' diarrhea. ETEC candidate vaccines are still in progress, which is designed to provide a long and wide-spectrum protection for ETEC infections. This paper briefly summarizes the advanced findings and key problems of vaccine development, and discusses prospects for future research.

Keywords: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), diarrhea, immunity, vaccine

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571374, 30771603, 31072136, 31270171), by the Jiangsu High Education Key Basic Science Foundation (08KJA230002), by the Genetically Modified Organisms Technology Major Project of China (2014ZX08006-001B) and by the Program Granted for Scientific Innovation Research of College Graduate in Jiangsu Province (KYLX_1359)

*Corresponding author. Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@yzu.edu.cn

Received: 10 June 2015; Revised: 1 September 2015; Published online: 11 September 2015