

New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections

Part I¹

In December 1998 an international meeting was organized in Japan by WHO in collaboration with the following Japanese institutions: the Research Institute, the International Medical Centre, the National Institute of Infectious Diseases and the National Children's Medical Research Centre. The meeting brought together epidemiologists, vaccine developers and experts in regulatory, standardization and control issues. Presentations on epidemiology and vaccine strategies under development were followed by reviews on regulatory issues regarding demand, supply and quality control. This article presents an update on research for ETEC/EHEC vaccine development and summarizes the highlights and recommendations of this meeting. It is divided in 3 parts related to (1) ETEC vaccines, (2) EHEC vaccines and (3) regulatory and quality control issues.

Enterotoxinogenic *E. coli* (ETEC) vaccines

Disease burden

Among children aged <5 years in the developing world, the annual burden of diarrhoea is estimated to be 1.5 billion episodes, accounting for 3 million deaths. In community-based studies of children in these settings, enterotoxinogenic *Escherichia coli* (ETEC) is the most frequently isolated enteropathogen, accounting for about 210 million diarrhoea episodes and approximately 380 000 deaths annually. The peak of incidence of ETEC diarrhoea in these settings occurs in the first year of life, with a declining incidence with age thereafter. Although ETEC is usually thought of as a childhood disease, due to its substantially higher incidence in early childhood than in older age groups, surveillance of hospitalized cases of ETEC diarrhoea has shown that almost half of such cases occur in persons aged >10 years, due to the large denominator population at risk in these older age groups. In children, the tendency of ETEC to cause dehydrating diarrhoea is less (approximately 5% of episodes) than that for rotavirus (approximately 36% of episodes). However, because the incidence of ETEC diarrhoea is considerably more common than rotavirus diarrhoea in children, the absolute number of dehydrating diarrhoea episodes due to ETEC is around 70% of the number of such episodes due to rotavirus. In addition, unlike rotavirus, ETEC diarrhoea in children has been associated with subsequent growth faltering.

Target populations for potential immunization

Natural history studies of ETEC infections in children in developing countries have suggested that these infections are immunizing, as reflected by declining rates of ETEC diarrhoea with age, lower ratios of symptomatic to asymptomatic ETEC infections with increasing age, and the protective relationships between initial ETEC infections and subsequent infections that have similar toxin and/or colonization factor phenotypes. These data therefore suggest that immunization against ETEC early in life may well be an effective preventive strategy. Because of the scarcity of financial resources for new vaccines in developing countries, and because vaccine administration costs account for

Nouveaux développements dans la mise au point de vaccins contre les infections à *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et entérohémorragique (EHEC)

Partie I¹

L'OMS a organisé en décembre 1998 une réunion internationale au Japon en collaboration avec les institutions japonaises suivantes: l'Institut de recherche, le Centre médical international du Japon, l'Institut national des maladies infectieuses et le Centre national de recherche médicale pour les enfants. Cette réunion a rassemblé des épidémiologistes, des spécialistes chargés du développement des vaccins et des experts dans les questions de réglementation, de standardisation et de contrôle. Les exposés sur l'épidémiologie et les stratégies vaccinales en cours de développement ont été suivis par l'examen des questions de réglementation en relation avec la demande, la fourniture et le contrôle de qualité. Le présent article a pour objet de faire le point sur la recherche dans le développement de vaccins anti-ETEC/EHEC et il résume les points forts et les recommandations de la réunion. Il se divise en 3 parties traitant 1) des vaccins anti-ETEC, 2) des vaccins anti-EHEC et 3) des questions relatives à la réglementation et au contrôle de qualité.

Vaccins contre *E. coli* entérotoxigène (ETEC)

Fardeau de morbidité

Chez les enfants de <5 ans vivant dans le monde en développement, on estime la morbidité annuelle pour les diarrhées à 1,5 milliard d'épisodes par an, entraînant 3 millions de décès. Les études basées dans les communautés portant sur les enfants de ces milieux établissent que *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) est l'agent entérotoxigène le plus fréquemment isolé et qu'il est responsable de 210 millions d'épisodes diarrhéiques et d'environ 380 000 décès chaque année. Dans cet environnement, l'incidence des diarrhées à ETEC atteint son pic au cours de la première année de vie pour diminuer ensuite avec l'âge. Même si l'on pense d'habitude que les infections à ETEC sont des maladies infantiles, à cause de leur incidence beaucoup plus élevée dans la petite enfance, la surveillance des cas de diarrhée à ETEC hospitalisés a montré que près de la moitié d'entre eux survenaient chez les >10 ans à cause du grand nombre de personnes exposées dans ces tranches d'âge. Chez l'enfant, l'ETEC a une tendance moins grande à provoquer des diarrhées avec déshydratation que le rotavirus (environ 5% des épisodes contre 36%). Mais comme les diarrhées à ETEC sont bien plus courantes que celles à rotavirus, la proportion en valeur absolue du nombre d'épisodes diarrhéiques avec déshydratation dus à ETEC atteint 70% du nombre de ceux imputables au rotavirus. De surcroît, et à la différence du rotavirus, on a associé les diarrhées à ETEC à une cassure de la courbe de croissance par la suite.

Populations ciblées pour une vaccination éventuelle

Les études portant sur l'histoire naturelle des infections à ETEC chez l'enfant dans les pays en développement font penser que celles-ci ont un effet immunisant, qui se retrouve dans la diminution de la proportion des diarrhées à ETEC avec l'âge, dans la baisse de la proportion entre les affections symptomatiques et asymptomatiques et dans les relations de protection entre les infections initiales à ETEC et d'autres infections ultérieures dotées d'une toxine et/ou de phénotypes similaires concernant l'adhésine. Ces données indiquent donc que la vaccination contre l'ETEC à un stade précoce de l'existence pourrait bien être une stratégie efficace de prévention. Comme les moyens financiers sont limités pour les nouveaux vaccins dans les pays en développement et

¹ Parts II and III will appear in subsequent issues.

¹ Les Parties II et III paraîtront ultérieurement.

a large fraction of the cost of incorporating new vaccines into public health programmes in these settings, financial and practical considerations indicate that new ETEC vaccines for use in developing country populations should be targeted for incorporation into the existing schedule of immunization of the Expanded Programme on Immunization (EPI).

Travellers from industrialized to developing country settings – including military troops on deployment – constitute another target population for vaccination against ETEC. Studies of travellers to Africa, Asia and Latin America suggest that the risk of diarrhoea during brief trips is about 50%, with most episodes occurring during the first week after arrival. ETEC has been isolated from about 35% of such diarrhoea episodes, and is the most common cause of traveller's diarrhoea. Thus, travellers constitute an additional target group for vaccination against ETEC. Although a variety of non-vaccine strategies exist to prevent traveller's diarrhoea, including fastidious attention to diet and intake of certain antibiotics, non-compliance commonly vitiates the effectiveness of all of these strategies, and side-effects constitute a particular drawback for antibiotics. For these reasons, a vaccine against ETEC for use by travellers would be an attractive option. Evidence that such a strategy might be effective comes from a randomized, placebo-controlled trial of a 2-dose regimen of the recombinant toxin-killed whole cell (rBS-WC) cholera vaccine given to Finnish tourists visiting Morocco. This trial, which was undertaken to test vaccine efficacy against ETEC because of the antigenic similarity of the B subunits of cholera toxin and ETEC heat-labile (LT) toxin, found that vaccination prevented 23% of all diarrhoea episodes and 52% of episodes due to ETEC. Since the vaccine was designed to protect only against LT-associated ETEC diarrhoea, and since an appreciable fraction of ETEC diarrhoea is due to ETEC that produce only heat-stable toxin (ST), an even greater impact may be expected from new-generation vaccines constructed to broaden coverage to include protection against ST-only ETEC.

Vaccine strategies under development

Substantial progress has been made in the development and evaluation of new vaccine candidates against ETEC diarrhoea. Both killed and live vaccine candidates have been developed. The greatest progress has been made in the development of killed oral vaccines. Several approaches have been pursued to create killed vaccines, including vaccines consisting of purified colonization factors, vaccines consisting of LT-only or LT-ST toxoid, and edible transgenic plant vaccines that express cholera toxin B subunit. The most successful approach, developed by investigators at the University of Göteborg (Sweden), has been one in which cholera toxin rBS has been combined with 5 strains of formalin-killed ETEC cells that collectively express the colonization factors of greatest epidemiological importance in developing countries: CFA/I, CFA/II and CFA/IV. Phase 2 studies of 2-dose regimens of this vaccine have been done in Bangladesh, Egypt, Israel, Nicaragua, the United States and Europe. These studies have found the vaccine to be safe and immunogenic, as manifested by induction of mucosal antibody responses to rBS and the CFA components of the vaccine. A pilot efficacy trial of this vaccine in European tourists travelling to developing country destinations found the vaccine to confer about 80% protection against ST-ETEC diarrhoea (the only toxin phenotype detected in this study), although small

comme les coûts d'administration des vaccins représentent une part importante des dépenses liées à l'intégration de nouveaux vaccins dans les programmes de santé publique dans ces milieux, les considérations financières et pratiques conduisent à envisager d'incorporer les nouveaux vaccins anti-ETEC à utiliser dans les pays en développement dans le cadre du calendrier existant du Programme élargi de vaccination (PEV).

Les voyageurs en provenance des pays industrialisés et se rendant dans les pays en développement, y compris les troupes militaires se déployant sur le terrain, constituent une autre population cible de la vaccination contre l'ETEC. Les études portant sur les voyageurs en Afrique, en Amérique latine et en Asie indiquent que le risque de diarrhée au cours d'un bref séjour est d'environ 50%, la plupart des épisodes survenant au cours de la première semaine. On a isolé des ETEC dans environ 35% de ces épisodes diarrhéiques, et il s'agit de la cause la plus courante. C'est pourquoi ce groupe est une autre cible pour la vaccination anti-ETEC. Bien qu'il existe un certain nombre de stratégies non vaccinales pour prévenir la diarrhée du voyageur, dont une attention fastidieuse au régime alimentaire et la prise de certains antibiotiques, leur efficacité est réduite à néant si on ne les observe pas correctement et les effets secondaires sont un inconvénient propre aux antibiotiques. Pour toutes ces raisons, un vaccin anti-ETEC serait une option intéressante pour les voyageurs. La preuve qu'une telle stratégie pourrait être efficace vient d'un essai randomisé contre placebo faisant appel à l'administration de 2 doses d'un vaccin anticholérique recombinant à base de cellules entières tuées et de toxine (rBS-WC) chez des touristes finlandais en visite au Maroc. Cet essai, entrepris pour tester l'efficacité du vaccin contre l'ETEC à cause de la similitude antigénique entre les sous-unités B de la toxine cholérique et de la toxine thermolabile (LT) de l'ETEC, a établi que la vaccination évitait 23% des épisodes diarrhéiques et 52% de ceux imputables à l'ETEC. Comme le vaccin n'était conçu que pour protéger contre les diarrhées ETEC associées à LT, et comme une part importante des affections à ETEC est imputable à des bactéries produisant seulement des toxines thermostables (ST), on peut s'attendre à un effet encore plus grand des vaccins de nouvelle génération fabriqués pour élargir la protection conférée et couvrir les ETEC à ST seulement.

Stratégies vaccinales en cours d'élaboration

Des progrès importants sont intervenus dans le développement et l'évaluation de nouveaux vaccins candidats vivants ou tués contre les diarrhées à ETEC. Les plus grands progrès ont été réalisés dans la mise au point de vaccins oraux tués. On a eu recours à plusieurs méthodes pour les créer: vaccins composés d'adhésines purifiées, d'anatoxines LT seulement ou LT-ST, plantes transgéniques comestibles exprimant la sous-unité B de la toxine cholérique. L'approche la plus réussie, mise au point par des chercheurs de l'Université de Göteborg (Suède), a consisté à associer une toxine cholérique rBS à 5 souches d'ETEC tuées par le formol et exprimant collectivement les adhésines ayant la plus grande importance épidémiologique dans les pays en développement: CFA/I, CFA/II et CFA/IV. Les essais en phase 2 de l'administration de 2 doses vaccinales ont été réalisés au Bangladesh, en Egypte, aux Etats-Unis, en Israël, au Nicaragua et en Europe. Elles ont établi l'innocuité et l'immunogénicité du vaccin, ainsi que l'a démontré l'induction de la réponse immunitaire dans les muqueuses contre les éléments rBS et CFA du vaccin. Un essai pilote d'efficacité de ce vaccin sur des touristes européens se rendant dans les pays en développement a montré qu'il conférerait une protection d'environ 80% contre les diarrhées à ST-ETEC (le seul phénotype toxinique détecté dans cette étude) même si, par suite d'un certain nombre d'événements extérieurs incontrôlables, une estimation statistique précise de l'efficacité a été impossible. L'essai d'efficacité en phase 3 est en cours chez des voyageurs des Etats-Unis en Amé-

numbers of outcome events precluded statistically precise estimates of efficacy. Phase 3 trials of vaccine efficacy are ongoing in United States travellers to Latin America, European travellers to Kenya, Israeli military recruits, and Egyptian infants and young children. In addition, efforts to improve this vaccine are focusing on inclusion of additional colonization factors (especially CS17 and PCF0166), including colonization factors with cross-reactive epitopes, and on enhancing vaccine immunogenicity by using mucosal adjuvants and alternative delivery systems.

In Egypt, investigators from the United States Naval Medical Research Unit-3, in collaboration with the United States National Institute of Child Health and Human Development, have conducted several sequential Phase 2 studies of the Swedish killed oral ETEC vaccine in adults, schoolchildren, toddlers and infants. Studies in the first 3 age groups tested 2-dose regimens delivered at 2-week intervals, and found the vaccine to be safe and to induce credible antibody secretory cell (ASC) responses, reflecting mucosal immunization. These studies also found that serum IgG and IgA antibody responses to vaccine antigens served as reasonable surrogates for ASC responses, an observation of considerable importance for studies in infants, since the latter cannot obtain sufficient quantities of blood to evaluate ASC responses to all relevant vaccine antigens. The study in infants tested a 3-dose regimen, at 2-week intervals, and also found the vaccine to be safe. Because rates of serum antibody responses to vaccine colonization factor antigens were somewhat lower in this age group than in older age groups, and because IgG serum antibody titres suggested a benefit of adding a third dose to the 2-dose regimen used in older age groups, a randomized, placebo-controlled Phase 3 study of the vaccine, scheduled to commence in early 1999, will test a 3-dose regimen. This trial will be conducted in Abu Homos, a rural area near Alexandria (Egypt), where rates of ETEC diarrhoea approach or exceed 1 episode per child/year during each of the first 3 years of life. The trial will enroll 2 cohorts of infants and children aged 6-18 months in each of 2 consecutive years, and will follow the cohorts to assess 1-year vaccine efficacy. Because any eventual implementation of this ETEC vaccine would integrate dosing into the existing EPI schedule of routine infant immunizations, Phase 2 studies of the vaccine in this schedule are planned for the coming year. If data from the forthcoming Phase 2 and 3 studies prove to be encouraging, a Phase 3 trial of dosing within the EPI schedule would be anticipated.

Workers at the International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh are also planning evaluations of the Swedish vaccine in the target paediatric age group. In earlier studies in Bangladeshi adults, these investigators found that a 2-dose regimen of the vaccine elicited mucosal responses that were comparable in magnitude to the response observed to natural ETEC disease. Studies in both adults and children noted that, among many types of antibody responses tested (blood ASCs, plasma IgA antibodies, duodenal ASCs, IgA antibodies in duodenal and intestinal lavage secretions, and faecal IgA antibodies), blood ASCs proved to be the most sensitive measure of the immune response to vaccine antigens, though, as in the Egyptian studies mentioned above, plasma antibody responses served as suitable surrogates for blood ASC responses in both adults and children. Encouragingly, faecal antibody responses were noted in an appreciable fraction of vaccinees, suggesting that this type of assay may be useful for future studies of the vaccine in infants, in whom it is not feasible to evaluate blood ASC responses. It

rique latine, des voyageurs européens au Kenya, des recrues dans l'armée israélienne et des nourrissons et enfants en bas âge égyptiens. De surcroît, les efforts pour améliorer ce vaccin sont axés sur l'intégration de nouvelles adhésines (notamment la CS17 et la PCF0166), y compris des adhésines ayant des épitopes à réactions croisées, et sur le renforcement de l'immunogénicité vaccinale par l'utilisation d'adjuvants pour les muqueuses et d'autres systèmes de délivrance.

En Egypte, les chercheurs de l'Unité 3 de recherche médicale de la marine des Etats-Unis, en collaboration avec l'Institut national des Etats-Unis pour la santé de l'enfant et le développement humain, ont mené plusieurs études séquentielles en phase 2 du vaccin oral suédois à base d'ETEC tuées chez l'adulte, les enfants d'âge scolaire, d'âge préscolaire et les nourrissons. Dans les 3 premiers groupes, l'administration de 2 doses à 2 semaines d'intervalle a permis d'établir que le vaccin était sûr et qu'il induisait une réponse significative des cellules sécrétrices d'anticorps (ASC: *antibody secretory cells*), reflétant l'immunisation de la muqueuse. Ces études ont également permis de découvrir que les réponses des IgG et des IgA sériques aux antigènes vaccinaux jouaient un rôle auxiliaire raisonnable par rapport aux ASC, cette observation ayant une importance considérable pour les études chez les nourrissons, dans la mesure où il est impossible de prélever chez eux des quantités suffisantes de sang pour évaluer la réponse des ASC vis-à-vis de tous les antigènes vaccinaux concernés. L'étude chez les nourrissons a porté sur l'administration de 3 doses à 2 semaines d'intervalle et a également montré l'innocuité du vaccin. Comme les taux d'anticorps sériques contre les adhésines vaccinales sont quelque peu inférieurs à ceux observés dans les autres groupes d'âge, et comme les titres d'IgG sériques laissent penser qu'une troisième dose présenterait des avantages pour les nourrissons, il a été prévu d'entreprendre début 1999 un essai randomisé en phase 3 contre placebo avec administration de 3 doses. Il se déroulera à Abu Homos, une région rurale près d'Alexandrie (Egypte), où les taux de diarrhées à ETEC avoisinent ou dépassent 1 épisode par an et par enfant au cours des 3 premières années de vie. Pour cet essai, 2 cohortes de nourrissons et d'enfants âgés de 6 à 18 mois seront recrutées chaque année pendant 2 ans consécutifs et un suivi sera mis en place pour évaluer l'efficacité du vaccin sur 1 an. Comme l'instauration éventuelle de ce vaccin anti-ETEC s'intégrera dans le calendrier existant du PEV pour les vaccinations systématiques des nourrissons, l'essai en phase 2 est prévu pour l'année prochaine. Si les données des essais à venir en phases 2 et 3 donnent des résultats encourageants, un essai en phase 3 d'administration dans le cadre du calendrier du PEV suivra.

Le personnel travaillant au Centre international de recherche sur les maladies diarrhéiques au Bangladesh prévoit également d'évaluer le vaccin suédois dans le groupe d'âge pédiatrique ciblé. Dans les études antérieures chez les adultes de ce pays, les chercheurs ont découvert que l'administration des 2 doses vaccinales suscitait des réponses de la muqueuse comparables par leur ampleur à celles observées lors d'une infection naturelle à ETEC. Les essais chez les adultes comme chez les enfants ont établi que, parmi les nombreux types de réaction immunitaire testés (ASC sanguines, IgA plasmatiques, ASC duodénales, IgA dans les sécrétions résultant du lavage duodénal ou intestinal, IgA fécales), les ASC sanguines donnaient la mesure la plus sensible de la réaction immunitaire aux antigènes vaccinaux bien que, comme dans les études en Egypte rapportées ci-dessus, les anticorps plasmatiques aient pu remplacer convenablement la mesure de la réaction des ASC tant chez l'adulte que chez l'enfant. Il a été encourageant d'observer une réaction immunitaire dans les fèces d'une fraction appréciable de sujets vaccinés, ce qui laisse penser que ce type d'essai pourrait être utile dans le futur pour les études du vaccin chez le nourrisson, chez qui l'évaluation de la réponse des ASC

is noteworthy that in these studies a single dose of vaccine elicited significant immune responses, presumably due to the immunological priming of subjects by antecedent natural ETEC infections. Exhaustive microbiological evaluation of a systematic sample of patients suffering from diarrhoea seen at the hospital of the International Centre has revealed that about 20% of patients aged <5 years excreted ETEC, and that the distribution of ETEC isolates by toxin phenotypes was nearly identical to that reported for ETEC isolates globally (48% ST-only; 27% LT-ST; and 25% LT-only). Of these isolates, 31% expressed CFA/IV, 24% expressed CFA/I, and 21% expressed CFA/II, although other colonization factors, including CS7, PCF0166, PCF0159, CS17, and CFA/III were also detected.

The live vaccine approach is being pursued by investigators at the Center for Vaccine Development of the University of Maryland (United States). Their vaccine development strategy is to use live attenuated *Shigella* organisms as vectors for expression of ETEC fimbrial and LT antigens. Such constructs might thereby protect against both *Shigella* and ETEC. Among the multiple serotypes of *Shigella*, 5 (*S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 3a, *S. flexneri* 6, *S. sonnei*, and *S. dysenteriae* 1) account for most episodes of shigellosis globally. Similarly, although there are multiple types of fimbriae expressed by ETEC, CFA/I and CS1-6 (which are components of CFA/II and CFA/IV) account for the vast majority of fimbrial types encountered in ETEC clinical isolates. Finally, mutant LT expression might not only confer antitoxic immune protection, but also act as a mucosal immune adjuvant. With these considerations, the ultimate target of the approach will be to create a vaccine with all 5 *Shigella* serotypes as live vectors, with each vector expressing 1 or more of the relevant ETEC toxin and fimbrial antigens so that in aggregate all relevant ETEC antigens are expressed in the live vector mixture. To date, *Shigella flexneri* 2a vaccine candidates developed by this group have been based on mutations in guanine nucleotide biosynthesis (*guaBA*), intracellular spread (*virG*), and *Shigella* enterotoxins (*set* and *sen*). These strains have proved immunogenic in guinea-pigs, and have protected immunized animals against homologous *Shigella* challenges in Sereny tests. A strain containing all 4 types of mutations has also been found to be safe and to induce credible anti-*Shigella* immune responses in human volunteers. Genes expressing CFA/I, CS2, and CS3 as well as mutant LT have been successfully cloned and expressed in several of these *Shigella* strains. Work is continuing on the insertion of other relevant ETEC genes in these vectors.

Conclusion

The meeting recommended that future work should focus on several areas: (1) the burden of ETEC illness and its sequelae in different regions of the developing world; (2) the distribution of ETEC clinical isolates by toxin and CFA phenotypes in different areas of the developing world; (3) development and improvement of new ETEC vaccine candidates; (4) development of improved immunological tests for measuring responses to ETEC vaccines, particularly tests that can be used in infants and young children; and (5) Phase 1-3 studies of promising candidates in the 2 major target populations: infants and young children in developing countries and travellers from industrialized countries to developing countries.

sanguines n'est par réalisable. On notera que, dans ces essais, une dose vaccinale unique a suscité des réactions immunitaires significatives, sans doute à cause de l'amorçage immunologique des sujets imputable à des infections antérieures naturelles à ETEC. L'évaluation microbiologique exhaustive d'un échantillon systématique de patients diarrhéiques ayant consulté à l'hôpital du Centre international a montré qu'environ 20% de ceux âgés de <5 ans excrétaient des ETEC et que la répartition des isolats selon le phénotype toxinique était pratiquement identique à celle rapportée au niveau mondial (48% de ST seulement, 27% de ST-LT et 25% de LT seulement). Dans ces isolats, 31% exprimaient le CFA/IV, 24% le CFA/I, 21% le CFA/II et l'on a détecté d'autres adhésines: CS7, le PCF0166, le PCF0159, le CS17 et le CFA/III.

Les chercheurs du Centre pour le développement des vaccins de l'Université du Maryland (Etats-Unis) suivent quant à eux la voie du vaccin vivant. Leur stratégie consiste à utiliser des *Shigella* vivantes atténuées comme vecteurs de l'expression des antigènes de l'ETEC (toxine LT et pili). Ce genre de produit pourrait conférer une protection à la fois contre les shigelles et les ETEC. Parmi les multiples sérotypes de *Shigella*, 5 (*S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 3a, *S. flexneri* 6, *S. sonnei* et *S. dysenteriae* 1) sont responsables de la plupart des épisodes de shigellose dans le monde. De même, bien que l'ETEC exprime des pili (ou fimbriae) de types multiples, CFA/I et CS1-6 (qui sont des éléments de CFA/II et CFA/IV) se retrouvent dans la vaste majorité des types de pili rencontrés dans les isolements cliniques d'ETEC. Enfin l'expression d'une LT mutante pourrait non seulement conférer une protection immunitaire contre la toxine mais aussi servir d'adjuvant pour l'immunité de la muqueuse. Ces considérations prises en compte, le but ultime de cette approche consistera à créer un vaccin avec les 5 sérotypes de *Shigella* comme vecteurs vivants, chacun exprimant au moins 1 des antigènes des ETEC (toxine et pili) de façon à ce que tous les antigènes ETEC intéressants soient exprimés par le mélange de vecteurs vivants. A ce jour, les vaccins candidats à base de *Shigella flexneri* 2a développés par ce groupe ont reposé sur des mutations dans la biosynthèse du nucléotide guanidique (*guaBA*), dans la propagation intracellulaire (*virG*) et dans les entérotoxines de shigelles (*set* et *sen*). Ces souches ont démontré leur immunogénicité chez le cobaye et ont protégé les animaux vaccinés au cours des tests Sereny d'épreuve avec des *Shigella* homologues. On a également découvert l'innocuité d'une souche renfermant les 4 types de mutation et sa capacité à induire une réaction immunitaire significative anti-*Shigella* chez les volontaires humains. Les gènes exprimant CFA/I, CS2 et CS3 ainsi qu'une LT mutante ont été clonés avec succès et se sont exprimés dans plusieurs de ces souches de *Shigella*: le travail se poursuit pour insérer d'autres gènes intéressants des ETEC dans ces vecteurs.

Conclusion

La réunion a recommandé d'axer à l'avenir le travail sur plusieurs domaines: 1) le fardeau de morbidité imputable aux affections à ETEC et à leurs séquelles dans les différentes régions du monde en développement; 2) la répartition des isolements cliniques d'ETEC selon la toxine et les phénotypes de CFA dans les différentes régions du monde en développement; 3) le développement et l'amélioration de nouveaux vaccins candidats anti-ETEC; 4) le développement et l'amélioration de nouveaux tests immunologiques pour mesurer la réaction immunitaire aux vaccins anti-ETEC, notamment des épreuves susceptibles d'être utilisées chez le nourrisson et le jeune enfant; 5) l'essai en phases 1 à 3 des candidats prometteurs dans les 2 principales populations ciblées, les nourrissons et les enfants en bas âge dans les pays en développement, d'une part, et les voyageurs des pays industrialisés se rendant dans les pays en développement, d'autre part.