

بیماری زائی و واکسن ها علیه/شرشیاکلی انتروتوکسیژنیک

شهرام نظریان (PhD)*، جعفر امانی (PhD)^۲

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)
۲- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

دریافت: ۹۵/۱۱/۹، اصلاح: ۹۵/۱۲/۴، پذیرش: ۹۶/۱/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: باکتری/شرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli*)، یکی از عوامل شایع اسهال بوده و تلفات انسانی ناشی از آن حدود ۱۵۷۰۰۰ نفر در سال برآورد شده که معادل ۹ درصد از مرگ و میرهای ناشی از اسهال می باشد. توسعه واکسن علیه ETEC به عنوان سازوکار اولیه ایجاد مقاومت در برابر باکتری محسوب می شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی اهمیت و بیماری زایی باکتری ETEC و تحقیقات در زمینه واکسن علیه آن انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی جستجوی مقالات در بانک داده NCBI و با کلید واژه های/شرشیاکلی، فاکتورهای حدت زا، فاکتورهای کلونیزاسیون، انتروتوکسین، ایمنی و واکسن صورت گرفت. مقالات مرتبط جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بررسی مقالات نشان داد، ایمنی زائی مخاطی می تواند سبب ایجاد پاسخ های آنتی بادی ترشچی IgA شده و نقش مهمی در ایجاد محافظت علیه عفونت ETEC را ایفا می کند. تنوع و پراکندگی جغرافیایی سویه های باکتری یکی از مشکلات اصلی برای مقابله موثر با بیماری ناشی از ETEC است. یکی از نکات مهم، ارائه عوامل کلونیزاسیون مختلف بر سطح باکتری است. توسعه واکسن علیه باکتری وابسته به بررسی دقیق شیوع فاکتورهای کلونیزاسیون و توکسین سویه ها است.

نتیجه گیری: طراحی ایمونوژنهای چندگانه واجد فاکتورهای کلونیزاسیون مختلف و توکسین از ETEC میتواند تا حدود زیادی ایجاد ایمنی علیه طیف وسیعی از سویه های باکتری را سبب شود.

واژه های کلیدی: اسهال،/شرشیاکلی بیماری زا،/شرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، عوامل حدت زا، ایمنی مخاطی، واکسن.

مقدمه

بیماری های اسهالی ناشی از باکتری ها و ویروس ها از مشکلات مهم در حوزه بهداشتی جوامع انسانی به ویژه در کشورهای درحال توسعه محسوب شده و سبب مرگ و میر صدها هزار انسان از جمله کودکان می گردد (۱-۳). سویه های/شرشیاکلی مولد اسهال در مناطق مختلف دنیا گسترش زیادی داشته و بر اساس تفاوت های آنتی ژنی و سازوکار بیماری زایی به شش گروه انتروآگریگتیو، انتروهموراژیک، انترواینوسیو، انتروپاتوژنیک، ادهیرنت انتشار یافته و انتروتوکسیژنیک (ETEC)، تقسیم می شوند (۴-۶). شیوع اسهال ناشی از ETEC به ویژه در ساکنین مناطق محروم و افرادی که به چنین نواحی مسافرت می کنند، بالا است (۷و۸). در سال ۱۹۵۶ De و همکارانش نشان دادند که سویه/شرشیاکلی جدا شده از افراد مبتلا به اسهال شبه وبا، می تواند سبب تجمع مایعات و الکترولیت ها در لوپ های بسته شده روده خرگوش شود (۹). باکتری ETEC عامل ۱۵ تا ۲۰ درصد از اسهال کودکان زیر ۵ سال در کشورهای فقیر و شایع ترین علت بروز ۶۰ درصد از اسهال مسافرتی در آفریقا، آسیا و آمریکای لاتین است (۱۰و۱۱). در بسیاری از کشورهای یادشده میزان شیوع در نوزادان زیر ۱۲ ماه بسیار بالاتر گزارش شده است (۱۲-۱۰). تقریباً به طور سالیانه ۱۰ میلیون ابتلا به اسهال مسافرتی ناشی از ETEC در دنیا گزارش می شود در گزارشات

سازمانهای بهداشتی جهان، میزان تلفات انسانی ناشی از بروز اسهال ETEC حدود ۱۵۷۰۰۰ نفر در سال برآورد شده که تقریباً معادل ۹ درصد از مرگ و میرهای ناشی از اسهال می باشد (۱۳و۱۴). در سال ۲۰۱۳ مرگ ۴۲۰۰۰ کودک زیر ۵ سال به دلیل بروز اسهال ناشی از ETEC گزارش شد. در همین سال در آفریقا و جنوب آسیا مرگ بیش از ۸۹۰۰۰ هزار نفر با سن بالای ۵ سال نیز ثبت گردید (۱۱و۱۰). بر اساس این گزارشات میزان شیوع باکتری در جوامع با سن بالاتر از ۵ سال به ۴۴ میلیون نفر رسیده که در مقایسه با تعداد ۶ میلیون مبتلا به تیفوئید و ۳ میلیون مبتلا به کلرا، بسیار بیشتر است (۱۱و۱۰). از مشکلات اصلی برای مقابله با بیماری ناشی از ETEC، تنوع و پراکندگی جغرافیایی سویه های باکتری است. توسعه واکسن علیه باکتری وابسته به بررسی دقیق شیوع فاکتورهای کلونیزاسیون و توکسین سویه ها است. هرچند مطالعات اپیدمیولوژی که تاکنون انجام شده، آگاهی محققین را از شاخص بار بیماری مربوط به ETEC بیشتر می کند، با این حال هنوز کاستی های اطلاعاتی در خصوص میزان مرگ و میر، شیوع باکتری، تشخیص و مقابله با آن وجود دارد (۱۶و۱۵و۱۳). مطالعه حاضر به اهمیت باکتری ETEC و بیماری زایی آن، اطلاعات و نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در زمینه واکسن علیه آن پرداخته است.

*مسئول مقاله: دکتر شهرام نظریان

آدرس: تهران، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی. تلفن: ۰۲۱-۷۲۸۱۸۱۴۲

E-mail: kpnazari@ihu.ac.ir

مواد و روش‌ها

جستجوی الکترونیکی مقالات در پایگاه داده NCBI با استفاده از کلید واژه های /اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، فاکتورهای حدت‌زا، فاکتورهای کلونیزاسیون، انتروتوکسین، ایمنی و واکسن صورت گرفت. عناوین و چکیده های مقالات ارائه شده در پایگاه تهیه و خلاصه مقالات از لحاظ ارتباط موضوعی بررسی شد. مطالعاتی که مبتنی بر مکانیسم بیماری زائی، شیوع بیماری و ایمنی و واکسن‌سازی علیه باکتری ETEC بود، انتخاب و مطالعه شدند. همچنین از نتایج تحقیقات نویسندگان مقاله حاضر نیز استفاده گردید.

یافته‌ها

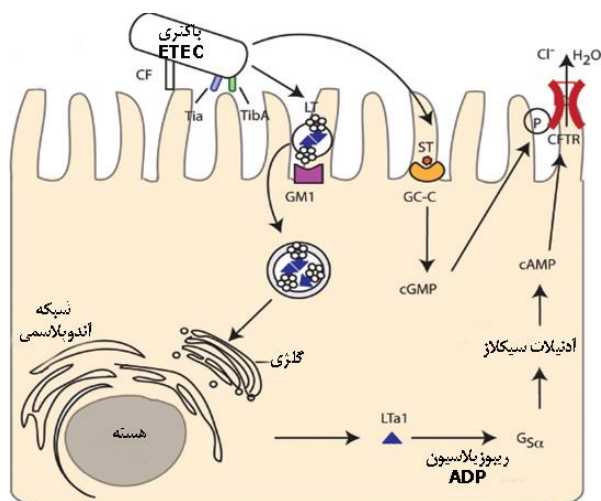
واژه اشرشیاکولی انتروتوکسیژنیک در عنوان، خلاصه مقاله و واژه های کلیدی ۳۷۵۷ مقاله در پایگاه داده Pubmed یافت شد. با محدود کردن جستجو به کمک عملگرهای بولی (Not, Or, And) به مقالات مرتبط با مکانیسم بیماری زائی، شیوع بیماری و ایمنی و واکسن‌سازی علیه باکتری، تعداد مقالات به ۷۵ رسید که وارد مطالعه شد.

عوامل حدت‌زا: بیماری با بلع ۱۰۶ تا ۱۰۱۰ عدد باکتری شروع شده و در ادامه باکتری از طریق فاکتورهای کلونیزه کننده سطحی خود به اپیتلیوم روده متصل و تجمع می یابد (۱۷ و ۱۸). عامل اصلی حدت زایی ETEC، انتروتوکسین حساس و یا مقاوم به حرارت است (۲۱-۱۹). سویه های ETEC می توانند تنها توکسین LT، ST و یا هر دو نوع را تولید کنند (شکل ۱). علاوه بر انتروتوکسین ها عوامل حدت‌زای دیگری از عوامل چسبندگی و فاکتورهای کلونیزاسیون و اگرسینها نیز مطرح می باشند (۲۴-۲۲). انتروتوکسین های حساس به حرارت نوع I (LT-1) و II (LT-II) از لحاظ خصوصیات ژنتیکی، بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی با هم متفاوت هستند. توکسین LT-1 بسیار شبیه به کلرا توکسین بوده، با وزن معادل ۸۶ کیلو دالتون مولکولی هترو هگزامری متشکل از زیر واحد B پنتامر و یک زیر واحد A است (شکل ۲) (۲۵ و ۲۶).

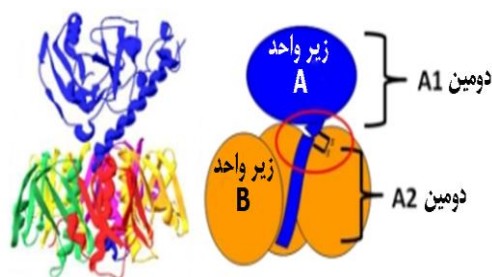
اتصال زیر واحد B به گانگلیوزید GM1 بر سطح سلول های میزبان موجب اندوسیتوز توکسین می گردد. زیر واحد A با جلوگیری از فعالیت GTPase پروتئین Gsα منجر به افزایش cAMP و تحریک کانال های کلر در غشای رآسی می گردد. با ترشح الکترولیتها و آب به درون روده، اسهال بروز می کند (۲۷ و ۱۸). توکسین LT-II با توکسین کلرا واکنش متقاطع ایمونولوژیک ندارد. میزان تشابه توالی آمینو اسیدی آن با توکسین کلرا و LT-1 به کمتر از ۱۴ درصد می رسد (۲۸ و ۲۵). اهمیت توکسین نوع ۲ در بیماری زایی انسان چندان شناخته نشده است (۲۸ و ۲۵). انتروتوکسین مقاوم به حرارت ETEC پپتیدهای کوچک غنی از سیستمین هستند (شکل ۳) که با افزایش cAMP درون سلولی سبب اختلال در عملکرد کانال های یونی شده و در نتیجه سلول های اپی تلیالی آب از دست داده و فرد بیمار دچار اسهال می شود (۳۰ و ۲۹).

انتروتوکسین مقاوم به حرارت نوع I و II توسط ETEC تولید می شود. توکسین STI (STa) که به گوانیلیل سیکلاز متصل و خود نیز به دو نوع (ST- Ia و ST-Ib) و ST-II تقسیم می گردد (۳۰ و ۱۸). یکی از مهم ترین عوامل بیماری زای باکتری /اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، فاکتورهای کلونیزاسیون (CFs) بوده و به عنوان هدف برای تهیه واکسن مورد توجه قرار دارند (۳۲ و ۳۱).

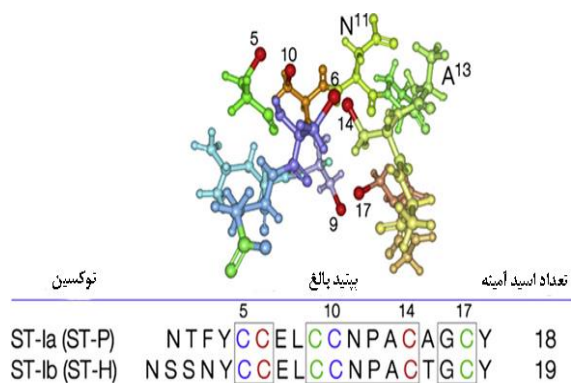
در حدود ۲۵ نوع مختلف CF تا امروز شناخته شده که بیشتر آنها توسط پلاسמיד کد می شوند (۵۰). عوامل کلونیزاسیون از جنس پروتئین و در سه گروه مختلف قرار می گیرند. گروه اول یا گروه شبه CFA/I شامل CS1، CS2، CS4، CS14 و CS17 هستند. گروه دوم یا گروه شبه CS5 که شامل فاکتورهای اتصالی CS5، CS7، CS18، CS20، CS3، CS6، CS10-12 است (۳۴ و ۳۳). اغلب فاکتورهای کلونیزاسیون باکتری ETEC از طریق مسیر فرعی چاپرون-راهنما، گردهمایی شده و بر سطح باکتری ارائه می شوند (شکل ۴).



شکل ۱. سازوکار ایجاد بیماری توسط باکتری /اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (۲۷).

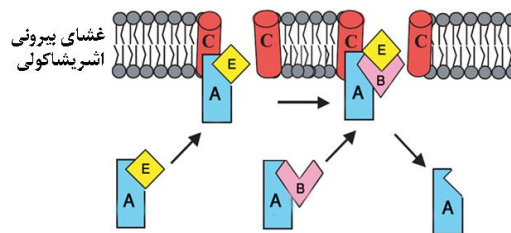


شکل ۲. ساختار توکسین حساس به حرارت باکتری /اشرشیاکلی و زیر واحدهای A و B (۳۰).



شکل ۳. ساختار و توالی توکسین مقاوم به حرارت باکتری از باکتری /اشرشیاکلی (۲۲).

واکسنهای زنده خوراکی ETEC: برای این منظور تاکنون راهبردهای مختلفی به کاررفته است و از شیگلا، ویبریکلرا و سالمونلای تخفیف حدت یافته که عوامل مختلف CF را به تنهایی یا همراه با توکسوئید LT بیان می‌کند، استفاده شده است. روش دیگر، استفاده از باکتری ETEC تخفیف حدت یافته به عنوان ناقل



آنتی ژن های مختلفی از جمله عوامل کلونیزاسیون و توکسین LT و ST در تهیه واکسن مد نظر قرار می گیرند (۳۳ و ۱۴ و ۳). آنتی ژن های O و H نیز در ایجاد محافظت علیه ETEC می توانند نقش داشته باشند اما به دلیل تعدد ساختار و تغییرات زیاد، کاندیدای مناسبی نیستند (۳۴ و ۱). مطالعات نشان داده که استفاده از عامل کلونیزاسیون و توکسوئید، ایمنی قابل قبولی را در افراد سبب می شود. بر اساس کارایی آنتی ژن CF و LT، واکسن ETEC بایستی حاوی آنتی ژن های CF باشد که در اکثر سویه ها یافت می شود. واکسن مولتی والان حاوی CFA/II-6 و CS1 و توکسوئید LT می تواند در برابر حدود ۸۰ درصد از سویه ها محافظت ایجاد کند. با توجه به اینکه برخی از سویه ها توانایی تولید توکسین ST

جدول ۱. رویکرد توسعه واکسن ها علیه ETEC

وضعیت پیشرفت	توسعه دهنده	کاندید واکسن
فاز ۲ کلینیکی	آزمایشگاه بیوتکنولوژی سوئد	سلول کامل چهار گانه غیر فعال شده به همراه توکسوئید LTB-CTB
فاز ۲ کلینیکی	PATH	سلول زنده تخفیف حدت یافته بر اساس ژنهای Omp, omp F, aroC به همراه ادجوانت dmLT
پیش کلینیکی	شرکت Prokarium	واکسن سلولی تیفوئید عرضه کننده توکسوئید LT-ST
پیش کلینیکی	مرکز توسعه واکسن CVD	نسل دوم شیگلای تخفیف حدت یافته عرضه کننده فاکتورهای کلونیزاسیون و توکسوئید LT
فاز ۲ کلینیکی	NMRC	واکسن زیر واحدی ضد فاکتورهای اتصال
پیش کلینیکی	دانشگاه کانزاس	واکسن زیر واحدی ضد فاکتورهای اتصال و توکسوئید
پیش کلینیکی	کنسرسیوم بین المللی واکسن روده ای	فیوژن LT-ST و کانزوگه LT و ST

بحث و نتیجه گیری

با در نظر گرفتن شواهد موجود از جمله اینکه اسهال ناشی از ETEC با افزایش سن کودکان به مرور کاهش می یابد و نیز رصد شدن آنتی بادی علیه فاکتورهای حدت زای باکتری در خون مبتلایان، بنظر می رسد پاسخ ایمنی به شکل طبیعی در این افراد بوجود می آید. بر این اساس می توان نتیجه گرفت که تولید واکسن ایمن و مؤثر علیه ETEC امکان پذیر است. هرچند مطالعات اپیدمیولوژی که تاکنون انجام شده است، آگاهی محققین را از شاخص بار بیماری مربوط به ETEC بیشتر می کند، با این حال هنوز کاستیهای اطلاعاتی در خصوص میزان مرگومیر، شیوع باکتری، تشخیص و مقابله با آن وجود دارد. بررسی های دقیق می تواند سبب کاهش نواقص اطلاعاتی شده و کمک شایانی در توسعه روش های مقابله با بیماری باشد. با توجه به اینکه مطالعات انجام شده در خصوص ایمنی زائی علیه ETEC تاکنون موفقیت زیادی را به دنبال نداشته است، استفاده از عوامل حدت زای شناخته شده به همراه جستارهای بیوانفورماتیکی ژنوم سویه های جدا شده می تواند چالش های پیش رو در توسعه واکسن هایی با میزان محافظت بسیار بالا علیه ETEC را مرتفع سازد. نتایج تحقیقات صورت گرفته نشان می دهد یکی از چالش های موجود در توسعه واکسن علیه ETEC وجود سویه های مختلف با فاکتورهای کلونیزاسیون متفاوت و متنوع می باشد که کارایی ایمونژن های منفرد را بسیار کاهش می دهد. براین اساس استفاده از پروتئین کایمر واجد کاندیدهای چندگانه می تواند راهگشا باشد. از دیگر مباحث مهم و کلیدی در زمینه کسب موفقیت در تهیه و تولید واکسن علیه پاتوژن های روده ای توجه به مسیر تجویز کاندیدای واکسن به بدن است. استفاده از نانوفناوری و همچنین گیاهان جهت تجویز خوراکی سبب عرضه مناسب ایمونژن ها به سیستم ایمنی مخاطی می شود. حمایت های مختلف سازمان هایی همچون سازمان بهداشت جهانی می تواند کمک شایانی جهت دستیابی به سازکارهای محافظتی مناسب علیه ETEC را فراهم آورد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهش دانشگاه جامع امام حسین (ع) تشکر و قدردانی می گردد.

و عرضه کننده آنتی ژن های محافظتی است. واکسن های تخفیف حدت یافته ETEC با حذف ژن ompC, ompF و aroC ساخته شده اند. PTLoo2 و PTLoo3 از سویه H16:O6 مشتق شده، واجد CS1+CS3 و دارای جهش در aroC است. کاندیدای واکسن CS4-CS6 و LTB همراه با CFA/I و CS1-CS3 نیز در این دسته قرار می گیرند (۵۷-۵۹). واکسن های هیبرید بر پایه شیگلای زنده ETEC/ ساخته شده که توانایی تولید مولکولهای CF یا LT را دارند. در یک مطالعه، چند شیگلای تخفیف حدت یافته شامل شیگلا فلکسنری 2a، فلکسنری 3a، فلکسنری ۶ و شیگلا سونتی مهندسی شدند تا بیان پایداری از فیمبریه ETEC و زیر واحد LTB داشته باشند. مصرف این واکسن در مدل بالینی، ترشح IgG سیستمی و IgA مخاطی علیه آنتی ژن های شیگلا و ETEC را سبب شد (۶۰-۶۱). واکسن های زنده تخفیف حدت یافته سالمونلا تایفی و ویبریوکلرا برای بررسی ایمونژنیستیه و سلامت در آزمون بالینی مورد بررسی قرار گرفته اند. این باکتریها زیر واحدهای CTB/LTB و مولکولهای مختلف CF بیان می کنند. به عنوان مثال در واکسن peru-15، سویه بیان کننده زیر واحد B از کلرا توکسین، می تواند به عنوان واکسن دوگانه برای کلرا/ ETEC باشد. در تحقیقات دیگری نیز فاکتورهای CF در سویه های واکسن سالمونلا و ویبریوکلرا تولید و بر سطح باکتری ارائه شده اند (۶۳ و ۶۲).

ایمونژن های کایمریک: در طراحی کاندیدهای واکسن امروزه توجه خاصی به پروتئین های کایمر می شود. پروتئین های کایمر دربردارنده زیر واحدهای پروتئینی، لینکرها و توالی های با خاصیت ادجوانتی نه تنها می توانند سبب افزایش خاصیت ایمونژنیستی پروتئین های نو ترکیب شوند بلکه امکان القا و بروز پاسخ های وسیع ایمنی سلولی و هومورال می شوند. چنانچه پروتئین کایمر واجد آنتی ژن از چند پاتوژن متفاوت و یا سویه های مختلفی از یک پاتوژن باشد، امکان ایجاد ایمنی هم زمان علیه عوامل مختلف فقط با یک پروتئین میسر خواهد شد (۶۴ و ۲۳). در مطالعه ای زیر واحدهای اصلی فاکتورهای CFA/I و CS2 و CS3 به صورت فیوژن بر سطح باکتری اشرشیاکلی ارائه شد. پروتئین کایمری دیگری نیز طراحی و تولید شده که در بردارنده فیمبریه K88 و توکسین های ETEC است. فیوژن پروتئین LTB-ST به صورت نانوکپسوله برای ایمنی زایی و محافظت در برابر توکسین مورد بررسی قرار گرفته است (۶۷-۶۵). نتایج تحقیق در خصوص پروتئین کایمر در بردارنده سه فاکتور کلونیزاسیون CFA/I، CS2، CS3 و زیر واحد B از توکسین LT از باکتری اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، نشان داد که سیستم ایمنی علیه هر چهار جزء پروتئینی تشکیل دهنده کایمر تحریک شده است (۱۶). از آنجا که فاکتور کلونیزاسیون CS6 نیز یکی از شایع ترین فاکتورهای کلونیزاسیون در سویه های ETEC می باشد، پروتئین کایمری متشکل از زیر واحد های اصلی و فرعی فاکتور اتصال CS6 و LTB طراحی و ایمنی زائی آن بررسی شده است (۵۵). همچنین نشان داده شده که استفاده از پروتئین کایمر واجد CfaB، CfaE و LTB می تواند تا مقادیر زیادی از عملکرد اتصال باکتری و اثرات توکسین حساس به حرارت آن بکاهد (۲).

طراحی فیوژن پروتئین نو ترکیب واجد CstH و LTB، پروتئین کایمر واجد فاکتورهای کلونیزاسیون CS6 و CFA/I و توکسین های مقاوم و حساس به حرارت باکتری نتایج مشابهی را در خصوص کارایی ایمونژن های چندگانه علیه ETEC را نشان می دهد (۵۴ و ۴۴). در جدول ۱ به طور خلاصه وضعیت و رویکرد توسعه واکسن ها علیه ETEC آورده شده است.

Pathogenesis and Vaccines against Enterotoxigenic Escherichia Coli

Sh. Nazarian (PhD)*¹, J. Amani (PhD)²

1.Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, I.R.Iran

2.Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(6); Jun 2017; PP: 13-21

Received: Jan 28th 2017, Revised: Feb 22th 2017, Accepted: Apr 9th 2017

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) is the most common causes of diarrhea and its mortality is estimated at 157,000 deaths per year that equivalent 9 percent of all deaths attributed to diarrhea. Vaccine development against ETEC has been identified as an important primary prevention strategy against bacteria. Present study aims to provide importance of and pathogenesis of ETEC bacteria and research in the field of vaccine against it.

METHODS: In this study literature search was conducted in NCBI databases with ETEC, virulence factors, colonization factors, enterotoxins and vaccine as keywords. Related articles were collected and investigated.

FINDINGS: Survey of articles indicated that mucosal immunization could provide the secretory IgA antibody (sIgA) response and are of particular importance for protection against ETEC infection. Diversity and geographical distribution of bacterial strains is one of the main problems to deal effectively against disease caused by ETEC. One of the important points is expressing of different CFs on bacterial surface. Development of a vaccine against bacteria and toxins strains is dependent on careful investigation of the prevalence of colonization factors and toxin strains.

CONCLUSION: Scrutiny could reduce information gaps and expected to help appropriately for development strategies against bacteria. Design multivalent ETEC immunogens containing the most prevalent colonization factors and toxins may provide protection against a wide range of ETEC strains.

KEY WORDS: *Diarrhea, Pathogenic Escherichia coli, Enterotoxigenic E.coli, Virulence factors, Mucosal immunity, Vaccine.*

Please cite this article as follows:

Nazarian Sh, Amani J. Pathogenesis and Vaccines against Enterotoxigenic Escherichia Coli. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(6):13-21.

* Corresponding author: Sh. Nazarian (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 72818142

E-mail: kpnazari@ihu.ac.ir

References

1. Bourgeois AL, Wierzbza TF, Walker RI. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*. 2016;34(26):2880-6.
2. Gheibi Hayat SM, Mousavi Gargari SL, Nazarian S. Construction and immunogenic properties of a chimeric protein comprising CfaE, CfaB and LTB against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biologicals*. 2016;44(6):503-10.
3. Zhang W, Sack DA. Current progress in developing subunit vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhea. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(9):983-91.
4. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):123-40.
5. Madhavan TV, Sakellaris H. Chapter Five-Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol*. 2015;90:155-97.
6. Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Darvish Alipoor S. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic *Escherichia coli* among Iranian children. *Jpn J Infect Dis* 2014;67(2):78-85.
7. Petri WA, Miller M, Binder HJ, Levine MM, Dillingham R, Guerrant RL. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J clin Invest*. 2008;118(4):1277-90.
8. Velarde JJ, Levine MM, Nataro JP. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease. 9th ed. Chapter 42 - *Escherichia coli* Diarrhea. London: W.B. Saunders; 2013. p. 442-7.
9. De S, Bhattacharya K, Sarkar J. A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J Pathol*. 1956;71(1):201-9.
10. Lamberti LM, Bourgeois AL, Walker CLF, Black RE, Sack D. Estimating diarrheal illness and deaths attributable to *Shigellae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* among older children, adolescents, and adults in South Asia and Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2): 2705.
11. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review. *Plos One*. 2013;8(9): 72788.
12. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *The Lancet*. 2013;380(9859):2095-128.
13. Svennerholm A-M, Lundgren A. Recent progress toward an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(4):495-507.
14. Zhang W, Sack DA. Progress and hurdles in the development of vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Expert Rev Vaccines* 2012;11(6):677-94.
15. Gupta S, Keck J, Ram P, Crump J, Miller M, Mintz E. Part III. Analysis of data gaps pertaining to enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol Infect* 2008;136(06):721-38.
16. Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Res*. 2014;169(2):205-12.
17. Fleckenstein JM. Chapter 6 - Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: D M, editor. *Escherichia coli*. Boston: Academic Press; 2013. p. 183-213.
18. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *escherichia coli* infection. *Microbes Infect*. 2010;12(2):89-98.
19. Gonzales-Siles L, Karlsson R, Kenny D, Karlsson A, Sjöling Å. Proteomic analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in neutral and alkaline conditions. *BMC Microbiol* 2017;17(1):11.
20. Hajizade A, Ebrahimi F, Amani J, Arpanaei A, Salmanian AH. Design and in silico analysis of pentavalent chimeric antigen against three enteropathogenic bacteria: enterotoxigenic *E. coli*, enterohemorrhagic *E. coli* and *Shigella*. *Biosci Biotechnol Res Com*. 2016;9(2):229-43.
21. Saldaña-Ahuactzi Z, Cruz-Córdova A, Rodea GE, Porta H, Navarro-Ocaña A, Eslava-Campos C, et al. Genome Sequence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain FMU073332. *Genome Announc* 2017;5(8):01600-16.
22. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes*. 2012;3(2):71-87.

23. Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. J Microb Method. 2012;90(1):36-45.
24. Kharat VB, Ahmed M, Jiang Z-D, Riddle MS, DuPont HL. Colonization Factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains in Travelers to Mexico, Guatemala, and India Compared with Children in Houston, Texas. Am J Trop Med Hygiene. 2017;96(1):83-7.
25. Joffré E, Sjöling Å. The LT1 and LT2 variants of the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile toxin (LT) are associated with major ETEC lineages. Gut Microbes. 2016;7(1):75-81.
26. Mudrak B, Kuehn MJ. Heat-labile enterotoxin: beyond G M1 binding. Toxins. 2010;2(6):1445-70.
27. Lasaro MA, Mathias-Santos C, Rodrigues JF, Ferreira L. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;55(1):93-9.
28. Connell TD. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type I and type II heat-labile enterotoxins. Expert Rev Vaccines. 2007;6(5):821-34.
29. Nandre RM, Duan Q, Wang Y, Zhang W. Passive antibodies derived from intramuscularly immunized toxoid fusion 3xSTa N12S-dmLT protect against STa+ enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhea in a pig model. Vaccine. 2017;35(4):552-6.
30. Sato T, Shimonishi Y. Structural features of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin that activates membrane-associated guanylyl cyclase. J Pep Res. 2004;63(3):200-6.
31. Mansouri M, Mousavy SJ, Ehsaei Z, Nazarian S, Zali MR, Moazzeni SM. The codon-optimization of cfaE gene and evaluating its high expression capacity and conserved immunogenicity in *Escherichia coli*. Biologicals 2013;41(3):169-75.
32. Sincock SA, Hall ER, Woods CM, O'Dowd A, Poole ST, McVeigh AL, et al. Immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin vaccine in mice and nonhuman primates. Vaccine. 2016;34(2):284-91.
33. Gastra W, Svennerholm A-M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Trend Microbiol. 1996;4(11):444-52.
34. Walker RI, Steele D, Aguado T, Committee AHETE. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. Vaccine. 2007;25(14):2545-66.
35. Svennerholm A-M, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Expert Rev Vaccines. 2008;7(6):795-804.
36. Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis. 2008;61(4):269-73.
37. Hoseinzadeh T, Ghanbarpour R, Rokhbakhsh-Zamin F. Phylogenetic background of enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* from patients with diarrhea in Sirjan, Iran. Iran J Microbiol 2016;8(3):187.
38. Katouli M, Jaafari A, Ketabi G. The role of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in acute diarrhoeal diseases in Bandar-Abbas, Iran. J Med Microbiol. 1988;27(1):71-4.
39. Salmani H, Azarnezhad A, Fayazi MR, Hosseini A. Pathotypic and Phylogenetic Study of Diarrheagenic *Escherichia coli* and Uropathogenic *E. coli* Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. Jundishapur journal of microbiology 2016;9(2): e28331.
40. Shahrokhi N, Bouzari S, Jafari A. Comparison of virulence markers and antibiotic resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated ten years apart in Tehran. J Inf Dev Count. 2010;5(04):248-54.
41. Isidean S, Riddle M, Savarino S, Porter C. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. Vaccine. 2011;29(37):6167-78.
42. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. Nat Rev Immunol. 2006;6(2):148-58.
43. Ahmed T, Bhuiyan TR, Zaman K, Sinclair D, Qadri F. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhoea. Cochrane Database Syst Rev. 2013;5(7):9029.
44. Zeinalzadeh N, Salmanian AH, Ahangari G, Sadeghi M, Amani J, Bathaie SZ, et al. Design and characterization of a chimeric multi-epitope construct containing CfaB, heat-stable toxoid, CsaA, CsaB, and heat-labile toxin subunit B of enterotoxigenic *Escherichia coli*: a bioinformatic approach. Biotechnol Appl Biochem. 2014;61(5):517-27.

45. Byrd W, Cassels FJ. Intranasal immunization of BALB/c mice with enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS6 encapsulated in biodegradable poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Vaccine*. 2006;24(9):1359-66.
46. 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;21(5):341-6.
47. Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, Preat V, Hoffman M, Maincent P. Stability study of nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone), poly (d, l-lactide) and poly (d, l-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. 1996;17(22):2191-7.
48. Tacket CO, Reid RH, Boedeker EC, Losonsky G, 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(14):1270-4.
49. Khan MS, Vishakante GD. Development and evaluation of porous chitosan nanoparticles for treatment of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *J Biomed Nanotechnol*. 2013;9(1):107-14.
50. Khalesi R, Salimian J, Nazarian S, Ehsaei Z, Amini N, Moazzeni SM. Production and purification of heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its detection by GM1 ganglioside receptor-ELISA based method. *Arak Med Univ J*. 2012;15(1):35-42.
51. Khalesi R, Sh N, Amani J, Ehsaei Z, Mansouri M, Moazzeni S, et al. Cloning and expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat labile toxin B subunit (LTB) as a vaccine candidate. *Trauma Month*. 2009;2009(2):95-100.
52. Khalesi R, Sh N, Ehsaei Z, Mansouri M, Amani J, Salimian J, et al. Optimization of gene expression and purification of enterotoxigenic *Escherichia coli* recombinant LTB protein and antibody production against it. *Trauma Month*. 2010;15(3):141-7.
53. Alerasol M, Gargari SLM, Nazarian S, Bagheri S. Immunogenicity of a fusion protein comprising coli surface antigen 3 and labile B Subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iran Biomed J*. 2014;18(4):212.
54. Kazemi R, Akhavian A, Amani J, Salimian J, Motamedi M-J, Mousavi A, et al. Immunogenic properties of trivalent recombinant protein composed of B-subunits of LT, STX-2, and CT toxins. *Microbes Infect*. 2016;18(6):421-9.
55. Bagheri S, Gargari SLM, Rasooli I, Nazarian S, Alerasol M. A CsaA, CsaB and LTB chimeric protein induces protection against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(3):308-14.
56. Tacket C. Plant-based oral vaccines: results of human trials. *Plant-produced Microbial Vaccines*: Springer; 2009. p. 103-17.
57. 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(2):994-1000.
58. McKenzie R, Darsley M, Thomas N, Randall R, Carpenter C, Forbes E, et 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):4731-9.
59. Turner AK, Beavis JC, Stephens JC, Greenwood J, Gewert C, Thomas N, et al. Construction and phase I clinical evaluation of the safety and immunogenicity of a candidate enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine strain expressing colonization factor antigen CFA/I. *Infect Immun*. 2006;74(2):1062-71.
60. Barry EM, Wang J, Wu T, Davis T, Levine MM. Immunogenicity of multivalent Shigella-ETEC candidate vaccine strains in a guinea pig model. *Vaccine*. 2006;24(18):3727-34.
61. Osorio M, Bray MD, Walker RI. Vaccine potential for inactivated shigellae. *Vaccine*. 2007;25(9):1581-92.
62. Roland KL, Cloninger C, Kochi SK, Thomas LJ, Tinge SA, Rouskey C, et al. 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):8574-84.
63. Ziethlow V, Favre D, Viret JF, Frey J, Stoffel MH. Assessment by electron-microscopy of recombinant *Vibrio cholerae* and *Salmonella* vaccine strains expressing enterotoxigenic *Escherichia coli*-specific surface antigens. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(3):282-6.
64. Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(3):209-19.
65. Deng G, Zeng J, Jian M, Liu W, Zhang Z, Liu X, et al. Nanoparticulated heat-stable (STa) and heat-labile B subunit (LTB) recombinant toxin improves vaccine protection against enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in mouse. *J Biosci Bioeng*. 2013;115(2):147-53.

66. Tobias J, Svennerholm A-M, Holmgren J, Lebens M. Construction and expression of immunogenic hybrid enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I and CS2 colonization fimbriae for use in vaccines. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87(4):1355-65.
67. Zhang C, Zhang W. *Escherichia coli* K88ac fimbriae expressing heat-labile and heat-stable (STa) toxin epitopes elicit antibodies that neutralize cholera toxin and STa toxin and inhibit adherence of K88ac fimbrial *E. coli*. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(12):1859-67.