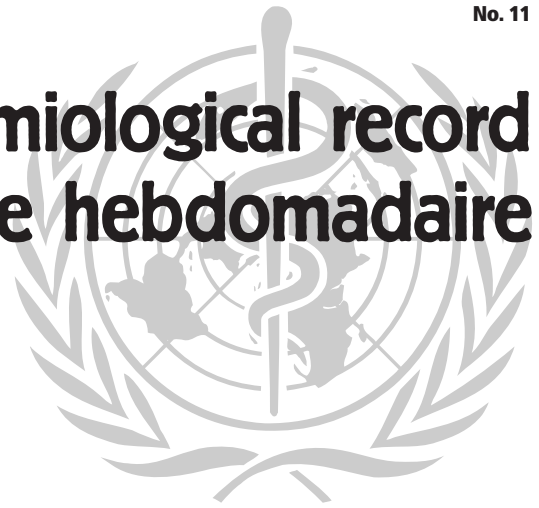


Weekly epidemiological record

Relevé épidémiologique hebdomadaire

17 MARCH 2006, 81st YEAR / 17 MARS 2006, 81^e ANNÉE

No. 11, 2006, 81, 97–104

<http://www.who.int/wer>

Contents

- 97 Future directions for research on enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries
- 104 Ports designated in application of the International Health Regulations
- 104 International Health Regulations

Sommaire

- 97 Orientations futures de la recherche sur les vaccins contre *Escherichia coli* entérotoxigène destinés aux pays en développement
- 104 Ports notifiés en application du Règlement sanitaire international
- 104 Règlement sanitaire international

Future directions for research on enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries

Background information

In December 1998, WHO convened an international meeting in Japan to examine the epidemiology and progress towards vaccine development for enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and enterohaemorrhagic *E. coli*. The meeting reviewed the then-known status of epidemiology and vaccine strategies and made a series of recommendations for the field.¹ Five years later, in 2003, a meeting in Montreux (Switzerland) sought to review the progress made in ETEC vaccine development and to evaluate the epidemiology and successes or failures of vaccine trials in young children in developing countries, to re-visit the recommendations and to determine the future needs for vaccine research for children in developing countries.

Global burden of diarrhoeal disease and the role of ETEC

ETEC is the most common cause of diarrhoea in the developing world, causing annually 280–400 million diarrhoeal episodes in children aged under 5 years and an additional 100 million episodes in children aged 5–14 years. Furthermore, ETEC causes substantial disease in adults in developing countries, with an estimated 400 million cases per year in people aged over 15 years. ETEC is also the most common cause of travellers' diarrhoea, being responsible for one-third to one-half of all diarrhoeal episodes in travellers to Africa, Asia and Latin America.

Orientations futures de la recherche sur les vaccins contre *Escherichia coli* entérotoxigène destinés aux pays en développement

Généralités

En décembre 1998, l'OMS a organisé une réunion internationale au Japon afin d'examiner l'épidémiologie des infections à *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) et à *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et les progrès réalisés dans la mise au point de vaccins. Au cours de cette réunion, on avait passé en revue l'épidémiologie et les stratégies vaccinales de l'époque et formulé une série de recommandations destinées au terrain.¹ Cinq ans plus tard, en 2003, les participants à une réunion organisée à Montreux (Suisse) se sont intéressés aux progrès réalisés dans la mise au point de vaccins contre l'ETEC et à l'évaluation de l'épidémiologie et des réussites et des échecs vaccinaux enregistrés lors d'essais effectués chez les jeunes enfants des pays en développement, ont réactualisé les recommandations et déterminé les besoins futurs de la recherche vaccinale pour les enfants des pays en développement.

La charge mondiale des maladies diarrhéiques et le rôle de l'ETEC

ETEC est la cause la plus commune de maladie diarrhéique dans les pays en développement et provoque chaque année 280 à 400 millions d'épisodes diarrhéiques chez les enfants de moins de 5 ans et 100 millions de plus chez ceux âgés de 5 à 14 ans. En outre, ETEC provoque un nombre non négligeable d'épisodes chez les adultes des pays en développement, avec un nombre estimé de 400 millions de cas par an chez les plus de 15 ans. Elle est également la cause la plus commune de diarrhée des voyageurs, étant responsable d'un tiers à la moitié de tous les épisodes diarrhéiques présentés par les voyageurs se rendant en Afrique, en Asie et en Amérique latine.

WORLD HEALTH
ORGANIZATION
Geneva

ORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉ
Genève

Annual subscription / Abonnement annuel
Sw. fr. / Fr. s. 334.–

03.2006
ISSN 0049-8114
Printed in Switzerland

¹ See No. 13, 1999, pp. 98–101.

¹ Voir N° 13, 1999, pp. 98–101.

EPEC causes disease by colonizing the small intestine and elaborating a heat-labile (LT) or heat-stable (ST) enterotoxin, or both. The resulting illness usually lasts 3–5 days and ranges from mild diarrhoea without dehydration to severe cholera-like disease. Although typically mild, the illness results in an estimated 300 000–500 000 deaths per year, mostly in young children. However, a recent report comparing estimates of the current global burden of diarrhoeal disease with previously published estimates has highlighted that the incidences of diarrhoea have not changed, although diarrhoeal mortality has declined.² For children aged under 5 years in developing countries, a median of 3.2 episodes of diarrhoea/child-year occurred, which is similar to that reported previously. Estimates of mortality indicated that 4.9 children/1000 per year died in these regions as a result of diarrhoeal illness in the first 5 years of life. This is a decline from the previous estimates of 13.6/1000 per year between 1959 and 1979 and of 5.6/1000 per year between 1980 and 1989. The decrease was most pronounced in infants aged under 1 year.

A multicentre study carried out by WHO to investigate EPEC morbidity in 5 developing countries identified EPEC in 11–18% of children aged under 3 years.³ Although the isolation of EPEC strains was uniformly higher than that of the control groups, EPEC carriage by healthy individuals was common, emphasizing the importance of calculating odds ratios for developing diarrhoeal disease in children colonized by EPEC strains.

Epidemiology of EPEC in developing countries

Recent longitudinal studies conducted in 3 developing countries (Bangladesh, Egypt and Guinea-Bissau) have revealed new insights into infection by and natural history of EPEC.

In Bangladesh, EPEC infection was the most common bacterial pathogen in infants and young children aged under 2 years with diarrhoeal illness. EPEC was also associated with severe disease in adults, especially the elderly (aged >65 years). The ST phenotype was most common and was associated with annual peaks detected during the spring; colonization factor antigen (CFA) I and CS5 and CS6 were the most predominant colonization factors.

In Guinea-Bissau, a longitudinal cohort study followed 200 children from birth until aged 2 years (median 18.4 months), with weekly collection of stool specimens. EPEC isolates were tested for the presence of the heat-stable porcine (STp) or human (STh) toxins, the LT toxin and 18 of the 21 known colonization factors (CFs). The rate of primary infections increased substantially after age 3–6 months depending on the type of EPEC causing the infection. During the study, several small EPEC “epidemics” were identified, which occurred mainly during the rainy season and largely with EPEC that were positive for STh.

EPEC provoque la maladie en colonisant l'intestin grêle et en fabriquant une entérotoxine thermolabile (LT) ou thermostable (ST), ou les deux. La maladie qui en résulte dure habituellement 3 à 5 jours et ses manifestations vont de la diarrhée bénigne sans déshydratation à la diarrhée grave de type choléra. Bien qu'habituellement bénin, l'épisode diarrhéique entraîne selon les estimations entre 300 000 et 500 000 décès par an, la plupart du temps chez de jeunes enfants. Toutefois, un rapport récent comparant les estimations de la charge de morbidité mondiale actuelle des maladies diarrhéiques avec les estimations précédemment publiées a fait apparaître que l'incidence de la diarrhée n'a pas changé, bien que la mortalité par diarrhée ait diminué.² Pour les enfants âgés de moins de 5 ans et vivant dans les pays en développement, on obtient une médiane de 3,2 épisodes de diarrhée/enfant-année, semblable à celle rapportée antérieurement. Les estimations de la mortalité indiquent que 4,9 enfants/1000 meurent chaque année dans ces régions par suite d'une maladie diarrhéique au cours des 5 premières années de leur vie. Ce chiffre est en diminution par rapport aux estimations antérieures, qui étaient 5 de 13,6/1000 par an entre 1959 et 1979 et de 5,6/1000 par an entre 1980 et 1989. C'est chez les nourrissons de moins d'1 an que la diminution est la plus prononcée.

Une étude multicentrique effectuée par l'OMS afin d'analyser la morbidité par EPEC dans 5 pays en développement a identifié cette bactérie chez 11 à 18 % des enfants âgés de moins de 3 ans.³ Si l'isolement des souches d'EPEC a été uniformément plus élevé que dans les groupes témoins, le portage de l'EPEC par des sujets en bonne santé était fréquent, soulignant l'importance qu'il y a à calculer les odds ratios relatifs à la survenue de la maladie diarrhéique chez les enfants colonisés par les souches d'EPEC.

Epidémiologie des infections à EPEC dans les pays en développement

Des études longitudinales récentes menées dans 3 pays en développement (le Bangladesh, l'Égypte et la Guinée-Bissau) ont permis de mieux comprendre l'infection à EPEC et l'histoire naturelle de cette maladie.

Au Bangladesh, l'EPEC est la bactérie pathogène la plus fréquemment retrouvée chez les nourrissons et les jeunes enfants de moins de 2 ans présentant une maladie diarrhéique. EPEC a également été associée à des épisodes graves chez l'adulte, surtout chez la personne âgée (>65 ans). Le phénotype ST est très courant et a été associé aux pics annuels recensés au printemps; l'antigène du facteur de colonisation (CFA) I, le CS5 et le CS6 sont les facteurs de colonisation que l'on rencontre le plus souvent.

En Guinée-Bissau, une étude de cohorte longitudinale a permis de suivre 200 enfants depuis la naissance jusqu'à l'âge de 2 ans (médiane 18,4 mois), avec prélèvement hebdomadaire d'échantillons de selles. Les isollements d'EPEC ont été testés à la recherche des toxines porcine (STp) ou humaine (STh) thermostables, de la toxine LT et de 18 des 21 facteurs de colonisation connus (CF). Le taux de primo-infection augmente nettement après l'âge de 3 à 6 mois, selon le type d'EPEC qui provoque l'infection. Au cours de l'étude, plusieurs petites «épidémies» d'infections à EPEC ont été identifiées, se produisant principalement au cours de la saison des pluies et, le plus souvent, avec des EPEC positives pour la STh. En outre, les

² Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*, 2003, 81:197–204.

³ Huilan S et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 1991, 69:549–555.

² Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 2003, 81:197–204.

³ Huilan S et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1991, 69:549–555.

Furthermore, the infections with STh-positive ETEC, but not with strains that were positive for the porcine heat-stable toxin (STo or ST all), were associated with diarrhoea. However, ETEC that were positive only for heat-labile toxin (LT) seemed to represent a mixture of both pathogenic and non-pathogenic types of ETEC.

In Egypt, studies conducted in the Nile Delta described the natural history of ETEC and diarrhoea in infants and young children. The children experienced multiple episodes of ETEC diarrhoeal illness, the first symptomatic exposure being very early in life. The toxin phenotypes did not confer protection against subsequent symptomatic infection, although CFA/I infection conferred protection against subsequent infections with this profile. Other CFs did not seem to have an impact on the risk of subsequent diarrhoeal episodes.

Current status of ETEC vaccine development

Evidence from epidemiological studies as well as volunteer studies supports a protective role for antibody responses against the fimbrial colonization factors. At least 20 distinct antigenic types of fimbrial CFs have been identified, with 7 types (including CFA/I and CS1–CS6) occurring most prevalently. The killed oral ETEC vaccine has been the vaccine most studied in clinical studies, but alternative approaches have been developed recently.

Killed oral vaccines against ETEC infections

The rationale behind developing the killed oral vaccine candidate was based on the concept that to provide broad-spectrum protection, an ETEC vaccine must contain the fimbrial antigens representative of the most prevalent ETEC pathogens, i.e. CFA/I and CS1–CS6, which are found in 50–80% of all clinical isolates, in particular in strains producing LT/ST or ST alone. Thus, a multivalent ETEC vaccine containing CFA/I, CS1–CS6 and an LT toxoid was envisaged to be able to provide protection against approximately 80% of ETEC strains worldwide. Recombinant cholera toxin B subunit (CTB) was also included.

Phase I and II trials of the CTB–CF ETEC vaccine in Bangladeshi and Egyptian adult volunteers have shown that the vaccine is well tolerated and gives rise to mucosal immune responses, i.e. peripheral blood antibody secretory cells (ASCs), against the rCTB (~95%) and against the different ETEC CFs in most (65–95%) of the volunteers. Analogous safety/immunogenicity clinical trials have been carried out with the rCTB–CF ETEC vaccine in Bangladeshi and Egyptian children down to 6 months of age. In these children, the vaccine was equally immunogenic as in the adults and also well tolerated except in the youngest Bangladeshi infants. Since increased frequency of vomiting was observed in 6–18-month-old Bangladeshi infants, a dose-finding study was initiated showing that a quarter of a full dose of rCTB–CF ETEC vaccine was equally safe and immunogenic in the youngest infants as a full dose in older children and adults in this endemic region.

Various studies to evaluate the protective efficacy of the rCTB–CF ETEC vaccine have been initiated in adult travelers going from industrialized areas to different countries in Asia, Africa and Latin America. In an initial small pilot

infections à ETEC STh-positives étaient associées à une diarrhée, contrairement à celles associées à des souches positives pour la toxine porcine thermostable (STo ou ST all). Toutefois, les souches d'ETEC qui n'étaient positives que pour la toxine thermolabile (LT) semblaient représenter un mélange de types d'ETEC pathogènes et non pathogènes.

En Egypte, les études menées dans le Delta du Nil visaient à décrire l'histoire naturelle d'ETEC et de la diarrhée chez les nourrissons et les jeunes enfants. Les enfants ont présenté de multiples épisodes de maladies diarrhéiques à ETEC, la première à exposition symptomatique ayant eu lieu très tôt au cours de la vie. Les phénotypes des toxines n'ont pas conféré de protection contre une infection symptomatique ultérieure, bien qu'une infection à CFA/I ait conféré une protection contre des infections ultérieures par des germes ayant ce profil. Les autres CF n'ont pas semblé avoir un effet sur le risque d'épisodes diarrhéiques ultérieurs.

Le point sur le développement d'un vaccin contre les infections à ETEC

Les données des études épidémiologiques et les études effectuées chez des volontaires vont dans le sens d'un rôle protecteur des réponses en anticorps contre les facteurs de colonisation fimbriaux. On a recensé au moins 20 types antigéniques distincts de CF fimbriaux, dont 7 ont une prévalence plus élevée (notamment CFA/I et CS1–CS6). Le vaccin anti-ETEC oral tué a été celui qu'on a le plus étudié en clinique, mais d'autres approches ont été développées récemment.

Vaccins oraux tués contre les infections à ETEC

La mise au point d'un vaccin candidat tué administré par voie orale repose sur l'idée que, pour fournir une protection à large spectre, un vaccin anti-ETEC doit contenir les antigènes fimbriaux représentant les souches d'ETEC les plus souvent retrouvées, à savoir CFA/I et CS1–CS6, que l'on retrouve dans 50 à 80% de tous les isolats cliniques, en particulier chez les souches produisant de la LT/ST ou de la ST seule. Ainsi, on a pensé qu'un vaccin anti-ETEC multivalent contenant le CFA/I, les CS1–CS6 et une anatoxine LT pourrait conférer une protection contre près de 80% des souches d'ETEC présentes dans le monde. On y a également inclus une sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) obtenue par recombinaison.

Les essais de phases I et II du vaccin anti-ETEC CTB–CF réalisés chez des volontaires adultes au Bangladesh et en Egypte ont montré qu'il est bien toléré et donne lieu à des réponses immunitaires muqueuses, c'est-à-dire à des réponses des cellules sécrétrices d'anticorps (ASC) du sang périphérique, contre la rCTB (~95%) et contre les différents CF chez la plupart (65–95%) des volontaires. Des essais cliniques d'innocuité/immunogénicité analogues ont été effectués avec le vaccin anti-ETEC rCTB–CF chez des enfants bangladais et égyptiens à partir de l'âge de 6 mois. Chez ces enfants, le vaccin a été aussi immunogène que chez les adultes et également bien toléré, sauf chez les nourrissons bangladais les plus jeunes. Puisqu'une fréquence accrue de vomissements a été observée chez ceux âgés de 6 à 18 mois, une étude de détermination de la dose a été lancée, montrant qu'un quart d'une dose complète de ce vaccin anti-ETEC rCTB–CF était aussi sûre et immunogène chez le jeune nourrisson qu'une dose complète chez les enfants plus âgés et les adultes de cette région d'endémie.

Diverses études visant à évaluer l'efficacité protectrice du vaccin anti-ETEC rCTB–CF ont été entreprises chez des voyageurs adultes se déplaçant à partir de régions industrialisées vers différents pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine. Dans une petite étude pilote

study, the vaccine was tested for protective efficacy in European travellers going to 20 different countries in Africa, Asia and Latin America. This study revealed highly promising results: the ETEC vaccine conferred 82% protective efficacy ($P < 0.05$) against ETEC disease. However, the number of cases fulfilling the inclusion criteria overall was low. In other clinical trials of the rCTB-CF ETEC vaccine in European travellers going to Kenya or in Israeli soldiers, no conclusions about the protective efficacy of the vaccine could be deduced because very few cases fulfilled the inclusion criteria.

A large placebo-controlled trial was recently completed in nearly 700 American travellers going to Mexico and Guatemala. In that study, rCTB-CF ETEC vaccine was effective (protective efficacy 77%; $P = 0.039$) against non-mild ETEC diarrhoeal illness, defined as diarrhoeal disease that interfered with the travellers' daily activities, but no significant protective efficacy was observed against ETEC diarrhoea of any severity, including mild cases. Another trial is now being completed in the same setting to assess vaccine efficacy against ETEC diarrhoeal disease.

The only paediatric study to assess efficacy of the rCTB-CF ETEC vaccine has recently been undertaken in rural Egypt. Initiated in 1999 and recently completed, this randomized, double-blind control trial was conducted in about 350 6–18-month-old children. Disease detection was based on active surveillance through semi-weekly household visits and cultures of faecal specimens from children with diarrhoea. Unfortunately, no significant protection was induced by the vaccine in this trial. Based on these disappointing results from testing of the vaccine in children in a developing country, the possibility of improving vaccine efficacy by using a suitable adjuvant or delivery form and/or by increasing the amounts of protective antigens, in particular the CFs, on the bacterial surface should be further explored.

Other inactivated ETEC vaccines approaches

Other approaches to inactivated ETEC vaccine have been undertaken, although purified CFs have drawbacks as an oral immunogen since they are expensive to prepare and sensitive to proteolytic degradation. To protect the fimbriae from degradation in the stomach, immunization with purified CFs incorporated into biodegradable microspheres has been attempted. However, no significant protection was induced against subsequent challenge with ETEC expressing the homologous CFs, when immunizing with either high doses of a combination of CS1 and CS3 or recombinantly produced CS6.

Live ETEC vaccines

The potential of live ETEC vaccines is suggested by previous findings in human volunteers that a live vaccine strain expressing CS1 and CS3 fimbriae, but lacking the genes encoding LT and ST, induced 75% protection against challenge with wild-type ETEC expressing corresponding CS factors as well as LT and ST. Different strategies have thereafter been attempted in which either attenuated *Shigella* or non-pathogenic *E. coli* express different CS components alone or in combination with an LT toxoid.

initiale, le vaccin a été testé chez des voyageurs européens se rendant dans 20 pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique latine. Cette étude a révélé des résultats extrêmement prometteurs: le vaccin anti-ETEC a eu une efficacité protectrice de 82% ($p < 0,05$) contre les diarrhées à ETEC. Toutefois, le nombre de cas remplissant les critères d'inclusion a été faible dans l'ensemble. Dans d'autres essais cliniques du vaccin anti-ETEC rCTB-CF effectués chez des voyageurs européens se rendant au Kenya ou chez des soldats israéliens, aucune conclusion n'a pu être tirée concernant l'efficacité protectrice du vaccin, car très peu de cas remplissaient les critères d'inclusion.

Un grand essai contre placebo a récemment été achevé chez près de 700 voyageurs américains se rendant au Mexique et au Guatemala. Dans cette étude, le vaccin anti-ETEC rCTB-CF a été efficace (efficacité protectrice de 77%; $p = 0,039$) contre les cas de maladie diarrhéique à ETEC non bénins, définis comme une maladie diarrhéique empêchant le voyageur de mener ses activités quotidiennes, mais aucune efficacité protectrice significative n'a été observée contre la diarrhée à ETEC de gravité variable, notamment les cas bénins. Un autre essai effectué dans les mêmes conditions et qui vise à évaluer l'efficacité du vaccin contre la maladie diarrhéique à ETEC est en cours d'achèvement.

La seule étude pédiatrique visant à évaluer l'efficacité du vaccin rCTB-CF ETEC a récemment été entreprise dans une région rurale d'Égypte. Démarré en 1999 et récemment achevé, cet essai contrôlé, randomisé, en double aveugle a été effectué chez environ 350 enfants âgés de 6 à 18 mois. Le dépistage de la maladie a été basé sur une surveillance active appliquée au moyen par le biais de visites bihebdomadaires et de coprocultures d'échantillons provenant d'enfants atteints de diarrhée. Malheureusement, aucune protection significative n'a été induite par le vaccin dans cet essai. Compte tenu de ces résultats décevants obtenus en testant le vaccin chez des enfants d'un pays en développement, il faudrait explorer plus avant la possibilité d'améliorer son efficacité en utilisant un adjuvant ou une forme d'administration adaptée et/ou en augmentant la quantité d'antigènes protecteurs, en particulier de CF à la surface de la bactérie.

Autres stratégies faisant appel à des vaccins anti-ETEC inactivés

D'autres approches ont été adoptées bien que les CF purifiés présentent des inconvénients comme immunogènes pour la voie orale, puisqu'ils sont coûteux à préparer et sensibles à la dégradation protéolytique. Pour protéger les fimbriae d'une dégradation dans l'estomac, la vaccination au moyen de CF purifiés incorporés dans des microsphères biodégradables a été tentée. Toutefois, aucune protection significative n'a été induite contre une inoculation d'épreuve ultérieure par une ETEC exprimant les CF homologues, après vaccination par des doses élevées d'une association de CS1 et de CS3, ou par des CS6 obtenus par génie génétique.

Vaccins anti-ETEC vivants

Le potentiel présenté par les vaccins anti-ETEC vivants est apparu lors des résultats antérieurs obtenus chez des volontaires avec une souche vaccinale vivante exprimant les fimbriae CS1 et CS3 mais dépourvue des gènes codants pour la LT et la ST, qui ont induit une protection de 75% contre une inoculation d'épreuve par une ETEC de type sauvage exprimant les facteurs CS correspondants, de même que la LT et la ST. Différentes stratégies ont été essayées par la suite, dans lesquelles des shigelles atténuées ou des *E. coli* non pathogènes expriment différents CS seuls, ou en association avec l'anatoxine LT.

Multivalent *Shigella*/EPEC vaccines

The Center for Vaccine Development at the University of Maryland in Baltimore (USA) is developing a live attenuated *Shigella* vaccine candidate for the expression and delivery of EPEC antigens. The *Shigella* strains were attenuated by precise deletions in biosynthetic and enterotoxin genes including *guaBa* (strain CVD1204) and *guaBA*, *set* and *sen* genes (CVD1208) and were demonstrated to be safe and immunogenic in pre-clinical studies. Furthermore, the strains were able to elicit a protective immune response in the animal model. These *Shigella* strains were used for the expression and delivery of EPEC antigens as a multivalent live oral *Shigella*-EPEC vaccine approach.

The 6 most commonly detected fimbrial types on human EPEC strains are thought to be essential for inclusion into potential vaccines. Thus, using the live attenuated *Shigella* strains, the genes encoding the CFA/I, CS2, CS3 and CS4 antigens were individually cloned into a stabilized plasmid system under the control of a strong promoter and transformed into the *Shigella* strains. Additionally, genes were engineered to encode the LT with 2 or 3 detoxifying mutations, or a B-subunit construct, and cloned into expression plasmids. Each plasmid was able to direct high-level expression of the EPEC antigens in the attenuated *Shigella* strains, and was able to elicit serum and mucosal responses in the guinea-pig immunization model.

The single, double and triple LT mutants as well as the B-subunit construct were all able to elicit antibody responses in the guinea-pig, which was able to neutralize wild-type toxin activity in Y1 cells. An inoculum composed of a mixture of 5 strains each expressing an individual EPEC antigen was able to elicit antibody responses against each of the 5 EPEC antigens as well as to the *Shigella* vector itself. Furthermore, plasmids were developed that directed the expression of multiple EPEC antigens in the *Shigella* vaccine strains and demonstrated the elicitation of strong serum and mucosal responses to each antigen in the multivalent construct following immunization of guinea-pigs. A vaccine composed of *S. flexneri* 2a expressing EPEC-CFA/I and CS3 and an attenuated *S. sonnei* expressing CS4 and the detoxified LT, when administered together, showed good immunogenicity to all 4 EPEC antigens and to protective responses to the *Shigella* vectors. Animals immunized with attenuated *Shigella* strains expressing EPEC antigens were protected against challenge with wild-type *Shigella* in the Sereny test.

Enlarging upon this successful strategy, different live *Shigella*-based multivalent *Shigella*/EPEC hybrid vaccines are being constructed where additional important fimbrial CFs are expressed along with mutated LT in attenuated *Shigella* strains. Following mucosal immunization of guinea-pigs with a mixture of 2 or more *Shigella* strains expressing the different CS antigens and modified LT, immune responses were observed against each EPEC antigen plus O-antigen of the *Shigella* vector strain. These candidate vaccine strains have been tested for safety and immunogenicity in both guinea-pigs and macaques. To explore this approach further, studies should be initiated to evaluate the possibility of simultaneously colonizing the

Vaccins anti-*Shigella*/EPEC multivalents

Le Center for Vaccine Development de l'Université de Maryland à Baltimore (Etats-Unis) met actuellement au point un vaccin candidat anti-*Shigella* vivant atténué pour l'expression et l'administration des antigènes d'EPEC. Les souches de *Shigella* ont été atténuées par des délétions précises au niveau des gènes de la biosynthèse et de l'entérotoxine, notamment les gènes *guaBa* (souche CVD1204) et *guaBA*, *set* et *sen* (CVD1208) et leur innocuité et leur immunogénicité ont été mises en évidence dans des études précliniques. En outre, ces souches ont été capables de susciter une réponse immunitaire protectrice dans le modèle animal. Ces souches de *Shigella* ont été utilisées pour exprimer et administrer des antigènes d'EPEC sous la forme d'un vaccin oral vivant multivalent contre *Shigella*-EPEC.

On pense que les 6 types fimbriaux les plus couramment détectés dans les souches d'EPEC humaines sont essentiels et doivent entrer dans la composition des vaccins potentiels. Ainsi, en utilisant les souches vivantes atténuées de shigelles, les gènes codants pour les antigènes CFA/I, CS2, CS3 et CS4 ont été clonés individuellement dans un système de plasmide stabilisé sous le contrôle d'un promoteur fort, puis transformés dans les souches de shigelles. De plus, on a obtenu par génie génétique des gènes codants pour la LT avec 2 ou 3 mutations détoxifiantes, ou pour une construction de la sous-unité B, et on les a clonés dans des plasmides d'expression. Chaque plasmide est capable de produire un haut degré d'expression des antigènes d'EPEC dans les souches de shigelles atténuées et de susciter des réponses sériques et muqueuses chez le cobaye, qui sert de modèle vaccinal.

Les mutants simples, doubles et triples de la LT, de même que la construction de la sous-unité B, ont tous été capables de susciter des réponses en anticorps chez le cobaye, qui a ainsi pu neutraliser l'activité de la toxine de type sauvage dans les cellules Y1. Un inoculum constitué d'un mélange de 5 souches exprimant chacune un antigène d'EPEC a été capable de susciter les réponses en anticorps contre chacun des 5 antigènes d'EPEC, de même que contre le vecteur shigelle lui-même. En outre, on a mis au point des plasmides qui dirigent l'expression de plusieurs antigènes d'EPEC dans la souche vaccinale de shigelles et on a montré qu'ils suscitaient de fortes réponses sériques et muqueuses contre chacun des antigènes présents dans la construction multivalente après vaccination de cobayes. Un vaccin composé de *S. flexneri* 2a exprimant le CFA/I et le CS3 d'EPEC et un autre constitué de *S. sonnei* atténué exprimant le CS4 et la LT détoxifiée, lorsqu'ils sont administrés ensemble, ont montré une bonne immunogénicité vis-à-vis des 4 antigènes d'EPEC et des réponses protectrices contre les shigelles vecteurs. Les animaux vaccinés par les souches de shigelles atténuées exprimant les antigènes d'EPEC ont été protégés contre une inoculation d'épreuve par des shigelles de type sauvage dans le test de Sereny.

S'appuyant sur le succès de cette stratégie, différents vaccins hybrides *Shigella*/EPEC vivants, multivalents, préparés à partir de *Shigella* sont en cours de fabrication, dans lesquels on exprime d'autres CF fimbriaux importants, ainsi que des LT mutées dans des souches atténuées de shigelles. Après vaccination muqueuse par un mélange d'au moins 2 souches de shigelles exprimant les différents antigènes CS et la LT modifiée, des réponses immunitaires ont été observées contre chacun des antigènes d'EPEC et contre l'antigène O de la souche vectrice de shigelles. L'innocuité et l'immunogénicité de ces souches vaccinales candidates ont été testées chez le cobaye et le macaque. Pour approfondir la question, il faudrait entreprendre des études afin d'évaluer la possibilité d'une colonisation simultanée de l'intestin humain par différentes souches de shigelles

human intestine with several different *Shigella* strains that all express the protective antigens sufficiently in vivo.

Genetically-attenuated ETEC strains as live oral vaccines

Another approach that has been attempted is to utilize attenuated ETEC strains as vectors of key protective antigens. The Johns Hopkins University School of Public Health in Baltimore (USA) is contributing to the development of live attenuated ETEC strains as potential vaccine candidates. A toxin-negative variant of the CS1 plus CS3 positive ETEC strain (E1392-75-2A) has been further attenuated by introducing 3 different combinations of defined deletion mutations into the chromosome. Evaluation of 2 such mutated strains (PTL002 and PTL003) in human volunteers has shown that they are safe and immunogenic when given in a single dose of 5×10^9 CFU. One of the mutant strains (PTL003) has been shown to induce immune responses against both CS1 and CS3 of comparable magnitudes as the wild-type strain. This strain will now be used in challenge studies to evaluate protective efficacy against challenge with ETEC expressing corresponding CFs.

In conclusion, PTL003 was a better colonizer and induced better immune responses to CFA/II antigens than PTL002 and appears to be fully immunogenic after a single dose. *ompR* is a response regulator affecting the expression of many genes and as such may have been over-attenuating in strain PTL002. A proof-of-concept challenge study is planned whereby adult volunteers would be vaccinated with the PTL003 construct and then challenged with a fully virulent ETEC strain to measure the protection afforded by this candidate in adults.

Transcutaneous immunization strategies for ETEC

Transcutaneous immunization is a novel strategy for administering adjuvant and antigen through the skin surface. The adjuvant and antigen apparently target Langerhans cells in the skin-eliciting systemic antibodies, including antitoxin antibodies, as well as inducing specific T-cell responses. A recombinant subunit vaccine was generated comprising the CS6 antigen with or without the LT in a patch format. The vaccine was administered to adult volunteers to evaluate the clinical safety and immunogenicity. The vaccine was administered in 3 doses at 0, 1 and 3 months, and serum antibodies and ASCs were assessed. There was no response to CS6 in the absence of LT. In the groups receiving both CS6 and LT in the patches, 68% showed serum anti-CS6 IgG and 53% serum IgA responses; 37% and 42% demonstrated anti-CS6 ASCs respectively. All of the volunteers receiving LT had anti-LT IgG; 90% also had serum anti-LT IgA. A phase II double-blind, randomized, placebo-controlled study to examine the safety on LT alone was conducted in 200 volunteers. The study showed no vaccine-related serious adverse events and no significant difference in systemic adverse events. The LT caused an increase of approximately 10% in local erythema at the patch site.

exprimant toutes les antigènes protecteurs en quantités suffisantes in vivo.

Souches d'ETEC génétiquement servant de vaccins oraux vivants

Une autre approche a consisté à utiliser des souches d'ETEC atténuées comme vecteurs des antigènes protecteurs importants. La Johns Hopkins University School of Public Health de Baltimore (Etats-Unis) participe à la mise au point de souches d'ETEC vivantes atténuées pouvant servir de vaccins candidats. Un variant toxine-négatif de la souche d'ETEC CS1 plus CS3-positive (E1392-75-2A) a été encore atténué en introduisant 3 combinaisons différentes de mutations de délétion précises dans le chromosome. L'évaluation de 2 de ces souches mutées (PTL002 et PTL003) chez des volontaires a montré qu'elles sont sûres et immunogènes lorsqu'elles sont administrées en une dose unique de 5×10^9 UFC. On a montré que l'une des souches mutantes (la PTL003) induisait les réponses immunitaires contre le CS1 et le CS3 d'une importance comparable à la souche de type sauvage. Cette souche va maintenant être utilisée dans des études d'inoculation d'épreuve afin d'évaluer son efficacité protectrice contre une inoculation d'ETEC exprimant les CF correspondants.

En conclusion, la souche PTL003 a mieux colonisé et provoqué de meilleures réponses immunitaires contre les antigènes CFA/II que la souche PTL002 et semble être pleinement immunogène après l'administration d'une dose unique. *LompR* est un régulateur de réponse qui modifie l'expression de nombreux gènes et qui en tant que tel, a peut-être trop atténué la souche PTL002. Une étude d'inoculation d'épreuve de validation est prévue, dans laquelle des volontaires adultes seront vaccinés par le PTL003, puis seront soumis à une inoculation d'épreuve par une souche d'ETEC pleinement virulente, afin de mesurer la protection conférée par ce vaccin candidat chez l'adulte.

Stratégies de vaccination anti-transcutanée ETEC

La vaccination transcutanée est une nouvelle stratégie d'administration de l'adjuvant et de l'antigène à travers la surface cutanée. L'adjuvant et l'antigène ciblent apparemment les cellules de Langerhans présentes dans l'épiderme – suscitant la fabrication d'anticorps systémiques, y compris des anticorps antitoxine et induisant des réponses spécifiques des lymphocytes T. Un vaccin sous-unité recombiné a été fabriqué, lequel comprend l'antigène CS6 avec ou sans la LT et se présente sous la forme d'un dispositif transdermique («patch»). Le vaccin a été administré à des volontaires adultes afin d'évaluer son innocuité clinique et son immunogénicité. Il a été administré en 3 doses appliquées à 0, 1 et 3 mois et l'on a évalué les anticorps sériques et les ASC. Il n'y a pas eu de réponse vis-à-vis de CS6 en l'absence de LT. Dans les groupes recevant à la fois le CS6 et la LT dans les «patch», 68% des sujets ont montré une réponse en IgG sériques anti-CS6 et 53% une réponse en IgA sériques; 37% et 42% ont montré des ASC anti-CS6, respectivement. Tous les volontaires recevant de la LT ont montré la présence d'IgG anti-LT; 90% présentaient également des IgA sériques anti-LT. Une étude contrôlée de phase II en double aveugle, randomisée contre placebo, a été effectuée chez 200 volontaires afin d'examiner l'innocuité de la LT seule. Cette étude a montré qu'il n'y avait aucune manifestation indésirable grave liée au vaccin et pas de différence significative dans les manifestations indésirables systémiques. La LT a provoqué une augmentation de près de 10% des érythèmes locaux au point d'application du dispositif transdermique («patch»).

Conjugate approaches to ETEC vaccines

The National Institutes of Health in Bethesda (USA) has pursued approaches for the development of a conjugate-based vaccine for ETEC. The working hypothesis is that serum transudate onto the mucous membrane is present in the duodenal, jejunal and colonic fluids. In addition, IgG confers protection against infectious diseases by killing the pathogen through the alternative pathway of complement. The principle is thus to induce serum IgG onto the mucosal membranes through parenteral inoculation, given that most oral inocula contain small quantities of viable organisms by the time they reach the jejunum. Several examples of parenteral-injected vaccines against enteric diseases are known, including poliomyelitis, typhoid fever and cholera. For instance, the efficacy of a Vi-rEPA conjugate vaccine against typhoid fever evaluated in 2–5-year-olds in Viet Nam showed 91.5% efficacy (95% CI 77.1–96.6%). A *Shigella sonnei* O-specific polysaccharide vaccine demonstrated significant protective efficacy in Israeli adult volunteers in 4 clinical studies (70%). In 4–7-year-olds, *S. sonnei* and *S. flexneri* 2a conjugate vaccines were shown to be safe and immunogenic.

WHO recommendations

1. The global estimates of ETEC disease incidence should be revised by region, age and clinical severity and need to include control groups in the assessment. Nested studies should include analyses of growth faltering and growth retardation, even when associated with milder ETEC disease. Regional population-based studies are needed using transparent and explicit methodology that are comparable across studies. Also recommended is the establishment of field sites with known population demographics to conduct the detailed studies.
2. A standardization of the laboratory techniques and methods used should be conducted. Existing regional networks for other diarrhoeal diseases in young children should be developed by laboratory strengthening to include ETEC studies. This will require the development and standardization of robust, ETEC-specific assays. The establishment of a WHO Collaborating Centre for ETEC is strongly recommended.
3. The proof-of-principle analyses of some specific CFs in generating protective antibodies should be undertaken with vaccine candidates. These could be established through adult volunteer studies before targeting children in endemic regions.
4. It is recognized that the markers of immune protection are still unclear and that studies should specifically examine the role of various immune mechanisms in protection. Parallel challenge studies are encouraged to elucidate which markers are important.
5. The development of new ETEC vaccine candidates is strongly encouraged as well as the clinical evaluation of the available ETEC vaccine candidates in children in endemic regions. The immunization schedule should mirror the country-specific calendar of immunizations.

Stratégies faisant appel à des vaccins anti-ETEC conjugués

Le *National Institutes of Health* de Bethesda (Etats-Unis) a poursuivi des études visant à mettre au point un vaccin conjugué contre ETEC. L'hypothèse de travail est qu'un transsudat sérique au niveau de la muqueuse est présent dans les liquides duodénaux, jéjunaux et coliques. En outre, les IgG confèrent une protection contre les maladies infectieuses en tuant le germe pathogène par l'autre voie que constitue le complément. Le principe est donc d'induire le fabricant d'IgG sériques au niveau des muqueuses par le biais d'une inoculation parentérale, étant donné que la plupart des inoculums administrés par voie orale contiennent très peu de germes viables au moment où ils atteignent le jejunum. On connaît plusieurs exemples de vaccins contre des maladies entériques injectés par voie parentérale, notamment des vaccins antipoliomyélitiques, antityphoïdiques et anticoléériques. Par exemple, l'évaluation d'un vaccin conjugué Vi-rEPA contre la fièvre typhoïde évaluée chez des enfants de 2 à 5 ans au Viet Nam a montré une efficacité de 91,5% (intervalle de confiance à 95%: 77,1 – 96,6%). Un vaccin préparé à partir du polysaccharide de l'antigène O de *Shigella sonnei* a fait la preuve d'une efficacité protectrice importante chez des volontaires adultes Israéliens dans 4 études cliniques (70%). Chez les 4 à 7 ans, on a montré que des vaccins conjugués préparés à partir de *S. sonnei* et *S. flexneri* 2a étaient sûrs et immunogènes.

Recommandations de l'OMS

1. Il convient de réviser, par régions et en fonction de l'âge et de la gravité clinique, les estimations mondiales relatives à l'incidence des infections à ETEC, qui devront par ailleurs comprendre des groupes témoins lors de l'évaluation. Les études nichées doivent comprendre des analyses des cassures de la courbe de croissance et du retard de croissance, même lorsque ces derniers sont associés à des infections à ETEC plus bénignes. Des études régionales en population, faisant appel à une méthodologie transparente et explicite permettant les comparaisons entre études, sont nécessaires. Il est également recommandé d'instituer sur le terrain des sites dont les données démographiques sont connues afin d'y effectuer des études détaillées.
2. Il convient de procéder à la normalisation des techniques de laboratoire et méthodes employées. Les réseaux régionaux existant pour les autres maladies diarrhéiques affectant le jeune enfant doivent être développés en renforçant les laboratoires afin qu'ils puissent procéder aux études de l'ETEC. Cela nécessitera la mise au point et la normalisation de dosages spécifiques solides. La création d'un centre collaborateur OMS pour l'ETEC est vivement recommandée.
3. Les analyses de validation de principe portant sur certains CF précis pour ce qui est de la production d'anticorps protecteurs doivent être entreprises avec les vaccins candidats. Elles pourraient être mises en place par le biais d'études chez des volontaires adultes, avant de cibler les enfants des régions d'endémie.
4. Il est admis que les marqueurs de la protection immunitaire sont encore mal connus et que des études devraient s'intéresser spécifiquement au rôle des divers mécanismes immunitaires dans la protection. Des études d'inoculation d'épreuve effectuées en parallèle sont encouragées afin de déterminer quels sont les marqueurs importants.
5. La mise au point de nouveaux vaccins candidats contre l'ETEC est vivement encouragée de même que l'évaluation clinique des vaccins candidats disponibles chez les enfants des régions d'endémie. Le calendrier vaccinal doit alors correspondre au calendrier de vaccination de chaque pays. Des études sérologi-

- Serological studies should confirm a lack of effect on EPI antigens.
- It was agreed that further studies of the killed oral ETEC vaccine are warranted in the target population aged under 12–24 months in endemic regions, given the good safety and immunogenicity record with this vaccine candidate. In addition, further studies should utilize the primary end-point as protection against severe disease or hospitalization associated with the vaccine-specific antigens.
 - WHO will continue to provide support to the national regulatory authorities of developing countries to reach international standards for vaccine regulation. Furthermore, recommendation was made to engage the regulatory authorities early to determine what hurdles exist to the regulatory pathway for ETEC vaccines. ■

- ques devront confirmer l'absence d'effet sur les antigènes du PEV.
- Il a été convenu que des études approfondies sur le vaccin anti-ETEC oral tué sont justifiées dans la population cible âgée de moins de 12-24 mois dans les régions d'endémie, étant donné le bon profil d'innocuité et d'immunogénicité de ce vaccin candidat. En outre, ces études devraient avoir pour critère principal la protection contre la maladie grave ou l'hospitalisation associée aux antigènes spécifiques du vaccin.
 - L'OMS continuera à fournir son appui aux autorités de réglementation nationales des pays en développement afin qu'ils puissent atteindre les normes internationales en matière de réglementation des vaccins. En outre, il a été recommandé d'inciter précocement les autorités de réglementation à déterminer quels sont les obstacles rencontrés sur le plan réglementaire concernant les vaccins anti-ETEC. ■

Ports designated in application of the International Health Regulations / Ports notifiés en application du Règlement sanitaire international

Amendments to the 1998 publication / Amendements à la publication de 1998

	D	EX
<i>Insert – Insérer:</i>		
Turkey – Turquie		
Aliaga		x
Eregli		x
Tekirdag		x
Zonguldak		x

WER No. 6, 2004

D: issue of deratting certificates. – Délivrance de certificats de dératisation.
 EX: issue of deratting exemption certificates. – Délivrance des certificats d'exemption de la dératisation.

How to obtain the WER through the Internet

- WHO WWW SERVER: Use WWW navigation software to connect to the WER pages at the following address: <http://www.who.int/wer/>
- An e-mail subscription service exists, which provides by electronic mail the table of contents of the WER, together with other short epidemiological bulletins. To subscribe, send a message to listserv@who.int. The subject field should be left blank and the body of the message should contain only the line subscribe wer-reh. A request for confirmation will be sent in reply.

Comment accéder au REH sur Internet?

- Par le serveur Web de l'OMS: A l'aide de votre logiciel de navigation WWW, connectez-vous à la page d'accueil du REH à l'adresse suivante: <http://www.who.int/wer/>
- Il existe également un service d'abonnement permettant de recevoir chaque semaine par courrier électronique la table des matières du REH ainsi que d'autres bulletins épidémiologiques. Pour vous abonner, merci d'envoyer un message à listserv@who.int en laissant vide le champ du sujet. Le texte lui-même ne devra contenir que la phrase suivante: subscribe wer-reh.

INTERNATIONAL HEALTH REGULATIONS / RÈGLEMENT SANITAIRE INTERNATIONAL

Notifications of diseases received from 10 to 16 March 2006 / Notifications de maladies reçues du 10 au 16 mars 2006

Cholera / Choléra

	Cases / Deaths Cas / Décès		Cases / Deaths Cas / Décès
Africa / Afrique		United Republic of Tanzania/ République-Unie de Tanzanie	
Angola	20.II-12.III 191 3	30.I-05.III 1019 27
Democratic Republic of the Congo/République Démocratique du Congo	30.I-19.II 1043 9	Zimbabwe	30.I-26.II 178 1

WWW access • <http://www.who.int/wer>
 E-mail • send message **subscribe wer-reh** to listserv@who.int
 Fax: +41-(0)22 791 48 21/791 42 85
 Contact: wantzc@who.int / wer@who.int

Accès WWW • <http://www.who.int/wer>
 Courrier électronique • envoyer message **subscribe wer-reh** à listserv@who.int
 Fax: +41-(0)22 791 48 21/791 42 85
 Contact: wantzc@who.int / wer@who.int