

Szczepionki genetyczne przeciw chorobom wirusowym ryb

MARIA PROST

Lublin

Prost M.

Genetic vaccines for viral diseases in fish

Summary

The article presents the results of current research on the effectiveness of recombinant and DNA vaccines against VHS and IHN viral diseases in rainbow trout – *Oncorhynchus mykiss*. The reasons for the insignificant effectiveness of recombinant vaccines and the 100% effectiveness of DNA vaccines have been discussed. The correlation of vaccine effectiveness to fish body weight as well as to the method of its administration, have been presented. The fish gain the maximum protection through the application of DNA vaccines via an intramuscular injection as well as after its subcutaneous introduction under pressure. Both methods of vaccination are difficult to carry out in breeding practice. That is why further research is necessary in order to develop a coat for the DNA vaccine in the form of a microsphere, which would facilitate a satisfactory immunological response after applying the vaccine by immersion and in the feed.

Keywords: rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, VHS disease, IHN disease, recombinant vaccines, DNA vaccines

Zwalczanie chorób ryb, zwłaszcza w warunkach hodowlanych, prowadzone było już od dawna. Początkowo stosowano chemioterapeutyki uzyskując przy wielu jednostkach chorobowych wyraźnie korzystne efekty leczenia. Stosowane związki chemiczne wywoływały jednak, jak się okazało, szereg negatywnych następstw. Była to przede wszystkim narastająca oporność polekowa patogenów wobec tych leków oraz ich toksyczność dla organizmu ryb. Istotny problem stwarzały także pozostałości tych związków w tkankach zwierzęcia oraz w środowisku wodnym, negatywnie je obciążając na długi niekiedy okres czasu.

Mankamenty chemioterapeutyków oraz mała ich skuteczność przeciw chorobom wirusowym, skierowały poszukiwania ichtiopatologów na inne jeszcze postępowania. Skuteczna okazała się immunoprofilaktyka. Zaczęto wytwarzać szczepionki, początkowo tradycyjne, w których antygenem były zabite lub atenuowane bakterie i wirusy. Dawały one dobre wyniki w zwalczaniu niektórych tylko chorób bakteryjnych, zwłaszcza wywołanych przez drobnoustroje z rodzaju *Vibrio* i *Yersinia*. Z tego powodu produkcja szczepionek komercyjnych była niewielka.

W zwalczaniu chorób wirusowych nieodzowne było, dla uzyskania lepszych efektów, zastosowanie innych jeszcze metod, a zwłaszcza bardziej skutecznych szczepionek. Wzorując się na osiągnięciach w immunoprofilaktyce stosowanej u ludzi, rozpoczęto badania nad wytwarzaniem szczepionek metodami biotechnologicznymi. Był to początek powstania szczepionek genetycznych.

Tematem obecnego referatu jest przedstawienie postępowania prowadzących do wytworzenia szczepionek genetycznych przeciw dwóm znaczącym chorobom ryb łososiowatych, zwłaszcza pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*). Chorobami tymi są – posocznica wirusowa łososiowatych (*Septicaemia hemorrhagica salmonum* – VHS) oraz zakaźna martwica układu krwiotwórczego (*Necrosis infectiosa systemae hematopoieticae salmonum* – IHN), powodujących poważne straty ekonomiczne w hodowli tych ryb w Europie i USA. Oba gatunki wirusów wywołujących te choroby należą do rodziny *Rhabdo*, a ich materiałem genetycznym jest RNA.

Wartość antygenowa białek wirusów VHS i IHN

Przed opracowaniem szczepionki genetycznej nieodzowne jest poznanie immunogenności każdego z białek wirusa, tak VHS, jak i IHN. Po znalezieniu najlepszego antygenowo białka izoluje się z genomu wirusa gen odpowiedzialny za jego syntezę. Gen ten służy następnie do wytwarzania szczepionki genetycznej.

Pierwsze próby wakcynacji szczepionką genetyczną pstrągów tęczowych przeciw chorobie IHN zostały wykonane w 1996 r. (1) Szczepionka ta zawierała gen kodujący tzw. białko G, wchodzące w skład glikoproteiny G. Wybór tego właśnie białka wynikał z poprzednich badań (6, 7, 13), które wykazały neutralizację patogenności wirusa VHS przez przeciwciała wywołane przez białko G. Dalsze badania potwierdziły najlepszą immunogenność tego właśnie białka w porównaniu do innych białek wirusowych (4). Przeprowa-

dzono następnie porównawczą wakcynację narybku pstrągów tęczowych o masie ciała 2 g, używając jako antygenów różnych białek wirusa IHN, a mianowicie: nukleoproteiny N, fosfoproteiny P, matrix proteiny M, białka NV oraz glikoproteiny G. Immunogenność każdej z tych szczepionek oceniano określając stopień przeżywalności szczepionego narybku po powtórny zakażeniu (zakażenie challenge) żywym wirusem, a także przez oznaczanie miana przeciwciał neutralizujących w surowicy krwi. Wyniki szczepień potwierdziły, że spośród badanych białek jedynie białko G (glikoproteina G) jest antygenem wywołującym najlepszą odpowiedź immunologiczną. Szczepionka zawierająca ten antygen wywoływała trwającą 80 dni odporność u ryb oraz obecność przeciwciał neutralizujących w ich surowicy krwi.

Szczepionki rekombinowane

Pierwsze szczepionki genetyczne stosowane przeciw chorobom wirusowym ryb były to tzw. szczepionki rekombinowane. Używano w nich jako antygenów białek wirusowych zawierających epitopy wiążące przeciwciała neutralizujące. Wyosobnienie tych białek wymagało wstępnych, skomplikowanych i kosztownych, zabiegów biotechnologicznych. Synteza wybranego białka antygenowego odbywa się bowiem w komórce bakterii *Escherichia coli*. Do jej plazmidu wbudowano gen wirusa kodujący wybrane białko antygenowe. Nie jest on jednak izolowany bezpośrednio z RNA wirusa. Plazmidy bakteryjne są bowiem zbudowane z DNA i stąd też skuteczna inkorporacja genu wirusa, który jest fragmentem RNA wymaga jego uprzedniej przebudowy chemicznej. Jest ona realizowana w wyniku reakcji enzymatycznej umożliwiającej proces odwrotnej transkrypcji. W tym to procesie na matrycy RNA genu wirusa powstaje DNA zwany cDNA. On to właśnie jest wbudowywany do plazmidu *E. coli*. Po uaktywnieniu tego genu w komórce bakteryjnej odbywa się synteza wirusowego białka G. Do produkcji szczepionki uzyskuje się go po przeprowadzonej lizie komórki bakteryjnej (15). Cały ten proces przeprowadzano niekiedy nie w komórkach bakteryjnych, ale w hodowli komórek drożdży lub owadów.

Pierwsza szczepionka rekombinowana została zastosowana przeciw chorobie IHN u pstrągów tęczowych. Do jej produkcji użyto genów kodujących glikoproteinę G. Szczepionkę podawano pstrągom tęczowym i innym rybom łososiowatym w iniekcji domięśniowej lub w kąpieli. Stopień uzyskanej odporności u szczepionych ryb oceniano na podstawie procentu śmiertelności po powtórnej infekcji challenge. Wynosił on od 0% do 19%, zaś u ryb nieszczepionych 64-92% (9). Wyniki szczepień wykonanych w praktyce na masowym materiale ryb nie były jednak tak korzystne. Nieodzwonne było podanie w szczepionce oprócz glikoproteiny G także i adiuwantu.

Szczepionka rekombinowana użyta przeciw chorobie VHS (11) okazała się mało skuteczna. Autorzy tych

badan przypuszczali, że jedną z przyczyn mogło być użycie komórek *E. coli* do uzyskania białka G. Białko to nie ulega bowiem związaniu z oligosacharydem i nie powstaje glikoproteina (przypuszczalnie z braku odpowiednich enzymów w komórce bakteryjnej). Drugą przyczyną mógł być brak uzyskania typowej spiralnej budowy przestrzennej cząsteczki białka, czyli jego właściwej konformacji.

Szczepionki DNA

Niepowodzenie w uzyskaniu skutecznych szczepionek rekombinowanych spowodowało poszukiwania innych jeszcze metod. Wzorując się na osiągnięciach immunoprofilaktycznych u ludzi wprowadzono do szczepionki tzw. nagi DNA (ang. naked DNA). W uproszczeniu metoda ta polega na wbudowaniu do plazmidu *E. coli* uaktywnionego genu kodującego białko G, po uprzednim uzyskaniu DNA z RNA wirusa. Tak przygotowane plazmidy podawano rybom jako szczepionkę. Antygen wirusowy czyli glikoproteina G nie jest więc wprowadzany rybom z zewnątrz, lecz syntetyzowany w organizmie ryby. Okazało się, że taka szczepionka powoduje znacznie lepszą niż rekombinowana odporność ryb zarówno przeciw chorobie IHN jak i VHS. W komórkach organizmu szczepionych ryb zachodzą bowiem dwa procesy warunkujące immunogenność antygenu białkowego: utworzenie typowej spiralnej struktury przestrzennej cząsteczki białka G oraz jego charakterystyczne związanie z węglowodanem. Stanowi to zasadniczą różnicę w przebiegu tych procesów, które odbywają się w komórce bakteryjnej, jak to ma miejsce przy produkcji szczepionki rekombinowanej oraz w komórkach ryb po podaniu im szczepionki DNA. Jedynie w komórkach ryb oba te procesy są skutecznie realizowane i to właśnie decyduje o wysokiej skuteczności szczepionki DNA. Po wakcynacji syntetyzowane w komórkach ryb białko G znajduje, jak wykazały badania (10, 12), warunki umożliwiające uzyskanie typowej konformacji dzięki ustabilizowaniu spirali jego cząsteczki przez sześć mostków dwusiarczkowych. Białko to zostaje również związane z czterema cząsteczkami oligosacharydu. Ostatecznie powstaje wówczas glikoproteina G jako wysoce immunogeny antygen.

Wakcynacja ryb szczepionką DNA przeciw IHN i VHS wykonana domięśniowo u narybku pstrągów tęczowych o masie ciała 2-4 g, zawierająca 10 ng plazmidów z „nagim DNA”, wywoływała odpowiedź immunologiczną u 100% szczepionych ryb (10). Sprawdzone to po zakażeniu challenge. Znaczne obniżenie śmiertelności ryb uzyskuje się po użyciu szczepionki zawierającej 1 ng plazmidu DNA. Powstanie odporności u ryb starszych ważących 120 g wymaga 100-krotnie wyższej dawki plazmidu DNA, a mianowicie 1 µg (8). Tak duża dawka po iniekcji domięśniowej wywołać może jednak stan zapalny tkanki mięśniowej. Polecane jest stąd szczepienie raczej małego, kilkugramowego narybku, tym bardziej, że właśnie on,

a nie ryby starsze, jest szczególnie podatny na zachorowanie zarówno na IHN, jak i na VHS.

Odporność po szczepieniu szczepionką DNA przeciw IHN i VHS pojawia się u ryb po 7-8 dniach od wakcynacji (10) i utrzymuje się przez około dwa miesiące. Po szczepionce tradycyjnej odpowiedź immunologiczna pojawia się dopiero po kilku tygodniach. Szczepionka DNA wywołuje więc znacznie szybszą reakcję układu immunologicznego ryb. Początkowo uaktywnia ona przypuszczalnie mechanizm obrony niespecyficzej. Obrona specyficzna pojawia się dopiero po 3-4 tygodniach (cyt. 12). Przeciwciała neutralizujące można stwierdzić w surowicy krwi szczepionych ryb zarówno po wakcynacji szczepionką DNA, jak i po podaniu im surowicy szczepionych nią ryb, czyli po immunizacji biernej (2). Obecność przeciwciał neutralizujących u ryb zależy jednak od dawki plazmidu DNA w szczepionce. Dawka 50 µg powoduje pojawianie się przeciwciał w surowicy, natomiast dawka 1 µg nie daje tego efektu. W obu przypadkach występuje jednak u ryb odporność stwierdzana po zakażeniu challenge (12). Zjawisko to jest trudne do wyjaśnienia i wymaga dalszych badań nad mechanizmami obrony specyficznej oraz nad procesem syntezy wirusowych białek G zależnie od stanu aktywności kodującego je genu zawartego w szczepionce DNA.

Wpływ wieku i masy ciała na wyniki szczepień

Czas utrzymywania się odporności u ryb po szczepionce DNA zależy od wieku ryb. Wyniki badań nad dojrzewaniem układu immunologicznego ryb wykazują, że proces ten zależy od masy ich ciała (5). Odpowiedź immunologiczna może pojawiać się już u ryb o masie ciała 1 g, ale pamięć immunologiczna wykształca się dopiero po osiągnięciu masy ponad 4 g. Szczepionka DNA zastosowana domięśniowo przeciw VHS u narybku o masie 4 g powoduje utrzymanie się odporności przez 5,5 miesięcy, natomiast u narybku o masie 1 g tylko przez trzy miesiące (10).

Wpływ sposobu podania szczepionki DNA na wyniki szczepień

W badaniach z tego zakresu (3) wykonano szczepienia przeciw IHN u narybku o masie ciała 1,8 g szczepionką zawierającą 100 ng plazmidu DNA. Podawano ją w różny sposób: w iniekcji domięśniowej, na skaryfikowaną skórę, w iniekcji dotrzewnowej, dogardzielowo, doskórnice pod ciśnieniem przy pomocy tzw. armatek genetycznych (gen gun) oraz w kąpieli (do wody wprowadzono szczepionkę w osłonkach polistyrenowych). Po 27 dniach od wakcynacji badano u ryb miano przeciwciał neutralizujących. Po dalszych dwóch dniach ryby szczepione i kontrolne poddano zakażeniu challenge (w kąpieli) celem kontroli ich odporności przeciw IHN. Wyniki tych badań wykazały, że przeciwciała neutralizujące nie występowały w surowicy krwi ryb niezależnie od sposobu podania szczepionki. Przyczyną tego według autorów wym.

pracy jest zbyt wczesne wykonanie kontroli wyników – 27 dni po wakcynacji. Dalsze obserwacje tych samych autorów wykazały, że przeciwciała pojawiają się w surowicy krwi ryb dopiero po 42 dniach od szczepienia (wyniki te nie były opublikowane). Stwierdzają to również inni autorzy (11), którzy podają, że okres ten wynosi 4-10 tygodni. Pojawiająca się niekiedy wcześniejsza odpowiedź immunologiczna jest przypuszczalnie wynikiem innych niż humoralne mechanizmów obronnych, np. procesów niespecyficzych.

Przeżywalność szczepionego narybku po zakażeniu challenge wynosiła po podaniu domięśniowym – 100%, doskórnym – 96,2%, dootrzewnowym – 50,3%, w kąpieli – 28,0%, na skaryfikowaną skórę – 25,9%, dogardzielowo – 11,1%. Powyższe dane wskazują, że korzystny efekt szczepienia uzyskuje się jedynie po podaniu domięśniowym szczepionki i doskórnice pod ciśnieniem.

Autorzy interpretują wyniki (3) w następujący sposób:

a) najlepsza odporność u narybku po szczepieniu domięśniowym i doskórnym jest przypuszczalnie wynikiem łatwiejszego dotarcia antygeny do monocytów i makrofagów prezentujących go limfocytom T przy równoczesnej aktywności innych mechanizmów obronnych, w tym np. głównego układu zgodności tkankowej (MHC),

b) niewielka odpowiedź immunologiczna po szczepieniu dootrzewnowym jest związana z trudnością dotarcia antygeny do komórek prezentujących go limfocytom T. Przypuszczalnie przy tego rodzaju podaniu szczepionki konieczne byłoby zastosowanie w niej większej dawki plazmidu DNA lub też równoczesne podanie adiuwantu,

c) niekorzystne wyniki szczepienia wykonanego w kąpieli ryb mogą być spowodowane przywieraniem plazmidu DNA do wewnętrznej ściany osłonki. Antygen stał się w ten sposób niedostępny dla komórek prezentujących go limfocytom T. Należałoby więc wykonać dalsze badania nad innego rodzaju osłonką niż polistyrenowa, do której nie przywierałby antygen. Szczepionka zawarta w osłonkach polistyrenowych była fagocytowana przez komórki ryb. Niepowodzenie szczepienia wykonywanego rydom w kąpieli nie było więc wynikiem braku przenikania szczepionki z wody do organizmu ryby. Potwierdzają to obserwacje innych autorów (14), którzy użyli również do szczepienia w kąpieli ryb tzw. mikrosfer, to jest kuleczek polistyrenowych zawierających szczepionkę. Stwierdzili oni, że zawarty w mikrosferach antygen był fagocytowany i docierał początkowo do skóry i skrzelii ryb, a następnie do narządów wewnętrznych, gdzie pozostawał przez 24 dni,

d) słaba odporność ryb po podaniu szczepionki na skaryfikowaną skórę jest przypuszczalnie spowodowana częściowym jej wypłukiwaniem w czasie ruchu ryb. Do eliminowania szczepionki ze zranionej skóry przyczyniły się zapewne także komórki Malpighiego

z przylegającego do miejsca podania szczepionki naskórka. Są to komórki uczestniczące aktywnie w usuwaniu obcych substancji ze skóry ryb,

e) najłabsze wyniki szczepień po podaniu dogardzielowym szczepionki należy tłumaczyć czynnym usuwaniem jej przez ryby z gardzieli i jamy gębowej do wody. Oprócz tego plazmidy DNA, które mogły być połączony ulegały przypuszczalnie rozkładowi w przewodzie pokarmowym. Autorzy spodziewają się uzyskać o wiele lepsze rezultaty po zastosowaniu odpowiednich mikrosfer, w których szczepionka mogłaby być zadawana rybom do karmy.

Przedstawione wyniki badań nad skutecznością szczepionek genetycznych przeciw chorobom ryb wywołanym przez wirusy *Rhabdo* pozwalają wprowadzić następujące wnioski:

1) skuteczność szczepionek DNA, dochodząca do 100%, jest o wiele lepsza niż szczepionek rekombinowanych. Należy przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości znajdą one praktyczne zastosowanie przeciw wirusowym chorobom ryb. Dodatkową ich zaletą jest stosunkowo prosta i niekosztowna produkcja,

2) istotnym obecnie problemem jest sposób stosowania szczepionki DNA w warunkach hodowlanych w dużej populacji ryb. Najbardziej skuteczne podanie szczepionki, w iniekcji domięśniowej oraz doskórne przy pomocy armatek genetycznych, jest trudne w praktycznej realizacji. Domięśniowa iniekcja dla narybku kilkugramowego (a u takich ryb powinna być stosowana) jest dla niego poważnym stresem. Oprócz tego zabieg ten jest bardzo pracochłonny. Zastosowanie szczepienia doskórnego przy pomocy armatek genetycznych jest również bardzo stresogenne dla narybku. Zabieg ten wykonuje się bowiem przez wprowadzenie doskórne pod ciśnieniem mikroskopijnych kuleczek złota opłaszczonych szczepionką. Wakcynacja tego rodzaju musiałaby być wykonana po odłowieniu indywidualnie każdej rybie. Przy zabiegu na masowym materiale byłoby to trudne do przeprowadzenia. W tych warunkach możliwe jest zastosowanie szczepionki jedynie w kąpieli lub w karmie. Mając do dyspozycji tak skuteczną broń przeciw chorobom wirusowym ryb jak szczepionki DNA należy podjąć starania celem opracowania takiej osłonki dla szczepionki, która umożliwiłaby dotarcie antygeny wirusowego do komórek układu immunologicznego, a w ostatecznym efekcie uzyskanie odporności u ryb.

Piśmiennictwo

1. Anderson E., Mourich D.V., Fahrenkrug S.C., La Patra S., Shepherd J., Leong J.C.: Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1996, 5, 114-122.
2. Boudinot P., Blanco M., de Kinkelin P., Benmansour A.: Combined DNA immunisation with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 1998, 249, 297-306.
3. Corbeil S., Kurath G., La Patra E.: Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish Shellfish Immunol.* 2000, 10, 711-723.

4. Corbeil S., La Patra E., Anderson E.D., Jones J., Vincent B., Hsa J.L., Kurath G.: Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Dis. Aquat. Org.* 1999, 39, 29-36.
5. Ellis A.E.: Ontogeny of the immune system in teleost fish. *Fish Vaccination* (A.E. Ellis, ed.), Academic Press London, 1988, s. 20-31.
6. Koener J.F., Passavant C.W., Kurath G., Leong C.: Nucleotide sequence of a DNA clone carrying the glycoprotein gene of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J. Virology* 1987, 61, 1342-1349.
7. Kurath G., Leong J.C.: Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J. Virology* 1985, 55, 460-468.
8. La Patra S.E., Corbeil S., Jones G.R., Shewmaker W.D., Kurath G.: The dose-dependent effect on protection and humoral response to a DNA vaccine against IHN virus in subyearling rainbow trout. *J. Aquatic Animal Health* 2000, 12, 181-188.
9. Leong J.C., Fryer J.L.: Viral vaccines for aquaculture. *Ann. Rev. of Fish Dis.* 1995, 5, 225-240.
10. Lorenzen E., Einer-Jensen K., Martinussen T., La Patra S.E., Lorenzen N.: DNA vaccination of rainbow trout against viral hemorrhagic septicemia virus: a dose-response and time course study. *J. Aquatic Animal Health* 2000, 12, 167-180.
11. Lorenzen N., La Patra S.E.: Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: an antibody response. *Fish Shellfish Immunol.* 1999, 9, 345-360.
12. Lorenzen N., Lorenzen E., Einer-Jensen K., La Patra S.E.: DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 2002, 12, 439-453.
13. Lorenzen N., Olesen N.J., Jorgensen E.V.: Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J. Gen. Virology* 1990, 71, 561-567.
14. Lorenzen N., Olesen N.J., Vestergaard Jorgensen P.E., Etzerodt M., Holter T.L., Thøgersen H.C.: Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *J. Gen. Virology* 1993, 74, 623-630.
15. Moore J.D., Ototake M., Nakanishi T.: Particulate antigen uptake during immersion immunization of fish. The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish Shellfish Immunol.* 1998, 8, 393-407.
16. Munn B.: The use of recombinant DNA technology in the development of fish vaccine. *Fish Shellfish Immunol.* 1994, 4, 459-473.

Adres autora: prof. dr hab. Maria Prost, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

PAIBA G. A., GIBBENS J. C., PASCOE S. J. S., WILESMITH J. W., KIDD S. A., BYRNE C., RYAN J. B. M., SMITH R. P., MCLAREN I. M., FUTTER R. J., KAY A. C. S., JONES Y. E., CHAPPELL S. A., WILLSHAW G. A., CHEASTY T.: Nosicielstwo w kale bydła i owiec *Escherichia coli* O157 produkującej verocytotoksynę stwierdzone w czasie uboju w Wielkiej Brytanii. (Faecal carriage of verocytotoxin – producing *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter in Great Britain). *Vet. Rec.* 150, 593-598, 2002 (19)

W okresie od stycznia 1999 r. do stycznia 2002 r. określano częstotliwość występowania *Escherichia coli* O157 produkujących verocytotoksynę (VTEC O157) w kale bydła i owiec poddawanych ubojowi w rzeźniach w Wielkiej Brytanii. Kał pobierano z prostrnicy 3939 sztuk bydła i 4171 owiec w 118 rzeźniach. W każdym roku 4,7% (4,1-5,4%) bydła i 1,7% (1,3-2,1% owiec) było nosicielami VTEC O157. Największe nosicielstwo występowało u zwierząt ubijanych latem. W lecie 5,5% (4,2-7,1%) bydła i 2,4% (1,6-3,5%) owiec było nosicielami VTEC O157. Najczęściej VTEC O157 izolowane od bydła należały do typu fagowego 2, 8, 21/28 zaś izolowane od owiec do typu fagowego 4 i 32. Te typy fagowe są najczęstszą przyczyną zachorowań ludzi w Wielkiej Brytanii.