

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Ivana Giovanna Zupčić

**Raznolikost bakterije *Vibrio harveyi* izdvojene iz uzgojenih riba
lubin (*Dicentrarchus labrax*) i komarča (*Sparus aurata*) u
Sredozemlju**

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: 1.05. Biologija i 4.01 Poljoprivreda

Raznolikost bakterije *Vibrio harveyi* izdvojene iz uzgojenih riba lubin (*Dicentrarchus labrax*) i komarča (*Sparus aurata*) u Sredozemlju

Ivana Giovanna Zupčić

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za patologiju riba Odjela za patološku morfologiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu

Mentori: Dr. sc. Snježana Zrnčić, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju
Izv. prof. dr. sc. Ivona Mladineo, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju

Uzgoj morske ribe u Sredozemlju kontinuirano raste, a najveći udio u uzgoju zauzimaju lubin (*Dicentrarchus labrax*) i komarča (*Sparus aurata*). Važan limitirajući čimbenik uzgoja su gubici uzrokovani bolestima, a najčešće su to bolesti uzrokovane bakterijama roda *Vibrio*, među kojima značajno mjesto zauzima *Vibrio harveyi*. Kako bi proširili saznanja o ovoj bakteriji, provedeno je opsežno istraživanje biokemijskih i genetskih osobitosti izolata prikupljenih iz različitih dijelova sredozemnog bazena. U istraživanje je uključeno ukupno 39 izolata bakterije. Utvrđeno je da su izolati bakterije *V. harveyi* korišteni u ovom istraživanju homogeni u svojim morfološkim i biokemijskim svojstvima bez obzira na geografsko porijeklo. Serotipizacijom istraživanih izolata utvrđeno je da pripadaju već poznatim serotipovima: A, B i C; međutim neki izolati ne pripadaju ni jednom od prije poznatih serotipova. Većina pretraživanih izolata ima zastupljene slične gene virulencije, neki od izolata imaju gene *sitA*, *sitB*, *sitC*, *sitD* i *ast* gen. Bioinformatičkom analizom utvrđena je prisutnost pet gena antimikrobne rezistencije: *CRP*, *adeF*, *E. coli parE*, *APH(3'')Ib* i *tet(D)*. Kod nekih izolata je testovima disk difuzije i mikrodilucije uočena osjetljivost na gentamicin, florfenikol i oksitetraciklin, a istovremeno su u njihovom genomu utvrđeni i geni antimikrobne rezistencije za iste antibiotike.

Broj stranica: 117

Broj slika: 11

Broj tablica: 15

Broj literaturnih navoda: 199

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *V. harveyi*, vibrioza, Sredozemno more, geni virulencije, geni antimikrobne rezistencije

Datum obrane: 27. rujna 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Doc. dr. sc. Tvrtko Smital, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, Institut Ruđer Bošković, predsjednik
2. Dr. sc. Dražen Oraić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, Hrvatski veterinarski institut, član
3. Prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica u trajnom zvanju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član
4. Dr. sc. Željko Mihaljević, znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, zamjena

Disertacija je pohranjena u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb
Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Interdisciplinary sciences

Scientific Fields: 1.05 Biology and 4.01 Agriculture

Diversity of bacteria *Vibrio harveyi* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) in the Mediterranean

Ivana Giovanna Zupičić

Thesis performed at: Laboratory for fish pathology, Department of pathology, Croatian veterinary institute, Zagreb

Supervisor: Snježana Zrnčić, PhD, Senior scientist permanent position

Ivona Mladineo, PhD, Assoc. Prof., Senior scientist permanent position

Short abstract: Marine fish farming in the Mediterranean basin is continuously growing and the dominant farmed species are European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and the Gilthead seabream (*Sparus aurata*). The industry is seriously affected by losses caused by bacterial diseases and those species from the genus *Vibrio* are among the most often causative agents. Over the recent period, *V. harveyi* has become more important, and to find out more about this pathogen we undertook an extensive study on the biochemical and genetic properties of isolates from different parts of the Mediterranean area. In total 39 isolates of *V. harveyi* isolated from sea bass and sea bream were included in this research. Isolates originated from farmed fish from the Croatian Adriatic Sea and different countries in the Mediterranean region. Isolates of *V. harveyi* were found to be homogeneous in their morphological and biochemical characteristics regardless of geographical affiliation. The studied isolates belong to already known serotypes: A, B, and C, however, some isolates do not belong to any of the previously known serotypes. Most of the isolates have similar virulence genes, while some of the isolates have *sitA*, *sitB*, *sitC* and *sitD* genes and *ast* genes. Bioinformatic analysis revealed the presence of five antimicrobial resistance genes: *CRP*, *adeF*, *E. coli parE*, *APH (3'')Ib*, and *tet(D)*. Some isolates that have shown sensitivity to gentamicin, florfenicol, and oxytetracycline by disc diffusion and microdilution (determination of minimal inhibitory concentration) methods have antimicrobial resistance genes for these antibiotics in their genome.

Number of pages: 117

Number of figures: 11

Number of tables: 15

Number of references: 199

Original in: Croatian

Key words: *V. harveyi*, vibriosis, Mediterranean Sea, virulence genes, antimicrobial resistance genes

Date of the thesis defense: 27th September 2022.

Reviewers:

1. Tvrtko Smital, PhD, Asst. Prof., senior scientist permanent position, Ruđer Bošković Institute, president of the committee
2. Dražen Oraić, PhD, senior scientist permanent position, Croatian veterinary Institute, member
3. Vera Cesar, PhD, Full professor, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, member
4. Željko Mihaljević, PhD, senior scientist, Croatian veterinary Institute, substitute

Thesis deposited in:

National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb
City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za patologiju riba Odjela za patološku morfologiju Hrvatskog veterinarskog instituta, pod mentorstvom dr. sc. Snježane Zrnčić i izv. prof. dr. sc. Ivone Mladineo u okviru projekta Europske unije za istraživanje i inovacije Obzor 2020 „Mediterranean Aquaculture Integrated Development, MedAID“ te, uz potporu Hrvatske zaklade za znanost u sklopu programa „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti” i Hrvatskog veterinarskog instituta unutar projekta „Višegodišnje institucijsko financiranje“.

ZAHVALE:

Posebnu zahvalnost upućujem mentorici dr. sc. Snježani Zrnčić na stručnom vodstvu, posvećenosti, trudu, razumijevanju i savjetima tijekom provedbe istraživanja i izrade doktorskog rada.

Također se srdačno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ivoni Mladineo na potpori, razumijevanju i korisnim sugestijama koji su doprinijeli realizaciji ovog rada.

Zahvaljujem se voditelju Laboratorija za patologiju riba dr. sc. Draženu Oraiću na velikoj pomoći i sugestijama.

Hvala i ostalim članovima Odjela za patološku morfologiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu na čelu s dr. sc. Željkom Mihaljevićem na pomoći i potpori tijekom izrade ovo rada.

Zahvaljujem i ostalim kolegama s Hrvatskog veterinarskog instituta na savjetima i pomoć, posebno dr. sc. Draganu Brniću koji me je podučio prvim koracima molekularne dijagnostike i bio potpora tijekom pisanja disertacije.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Tvrtku Smitalu koji je kao studijski savjetnik uvijek bio spreman savjetovati i pomoći.

Hvala prof. dr. sc. Belén Fouz Rodríguez sa Sveučilišta u Valenciji na pruženoj pomoći oko određivanja serotipova.

*Hvala prof. dr. sc. Süheyli Karataş Steinum, dr. sc. Tobii Preto i Alainu Le Breton, dr. vet. med. na nesebičnom dijeljenju izolata bakterije *V. harveyi*.*

Hvala mojoj obitelji, Karlu i svim meni dragim ljudima na podršci, svim savjetima te riječima ohrabrenja.

Giovanna

SADRŽAJ

Popis kratica

1. UVOD	1
1.1. Akvakultura Sredozemlja.....	1
1.2. Značajne ribe koje se uzgajaju u Sredozemlju.....	2
1.2.1. Europski lubin.....	2
1.2.2. Komarča.....	3
1.3. Bolesti riba u akvakulturi Sredozemlja.....	3
1.4. Značaj vibrioza u akvakulturi Sredozemlja.....	3
1.5. <i>Vibrio harveyi</i>	4
1.5.1. Taksonomija.....	5
1.5.2. Etiologija.....	5
1.5.3. Biokemijske i fiziološke osobitosti bakterije <i>V. harveyi</i>	5
1.5.4. Epidemiologija.....	6
1.5.5. Patogeneza.....	7
1.5.6. Čimbenici virulencije.....	8
1.5.7. Geni virulencije.....	9
1.5.8. Serotipizacija.....	10
1.5.9. Molekularna identifikacija.....	10
1.5.10. Svojstva genoma bakterije <i>V. harveyi</i>	11
1.5.11. Antimikrobna rezistentnost.....	11
1.5.12. Prevencija i liječenje.....	13
1. CILJEVI RADA	14
2. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Odabir izolata.....	15
3.2. Izdvajanje bakterija.....	16
3.3. Morfološke karakteristike kolonija.....	17
3.4. Biokemijska identifikacija izolata.....	17
3.4.1. Utvrđivanje pokretljivosti.....	17
3.4.2. Oksidacijsko-fermentacijska svojstva.....	18
3.4.3. Citokrom-oksidaza.....	18
3.4.4. Određivanje katalaze.....	19
3.4.5. Određivanje tipa hemolize.....	19

3.4.6. Sposobnost rasta na različitim temperaturama	19
3.4.7. Sposobnost rasta u različitim koncentracijama soli	19
3.4.8. Određivanje biokemijskih svojstava koristeći testni komplet API 20E.....	20
3.5. Molekularna identifikacija	20
3.5.1. Izdvajanje DNA iz bakterijskih kolonija	20
3.5.2. Umnažanje odsječka <i>16S rRNA</i> gena.....	21
3.5.3. Umnažanje odsječka <i>toxR</i> gena	22
3.5.4. Određivanje nukleotidnih slijedova gena.....	23
3.6. Serotipizacija	23
3.6.1.1. Priprema antigena za imunizaciju.....	23
3.6.1.2. Antiserumi.....	24
3.6.1.3. O antigen za testove aglutinacije	24
3.6.1.4. Testovi aglutinacije na predmetnom stakalcu.....	24
3.7. Određivanje antimikrobnih svojstava	25
3.7.1. Test disk difuzije.....	25
3.7.2. Test mikrodilucije	26
3.8. Sekvenciranje genoma	27
3.8.1. Izdvajanje DNA iz bakterijskih kolonija za sekvenciranje cijelog genoma	28
3.8.2. Kapilarna elektroforeza.....	28
3.8.3. Određivanje koncentracije DNA.....	28
3.8.4. Priprema knjižnice za sekvenciranje tehnologijom nanopora na uređaju ONT MinION	29
3.8.5. Sekvenciranje tehnologijom nanopora na uređaju ONT MinION.....	30
3.8.6. Priprema DNA izolata za sekvenciranje pomoću Illumina HiSeq sustava.....	30
3.8.7. Bioinformatička analiza slijedova dobivenih tehnologijom nanopora i Illumina HiSeq sustavom	30
3.9. Izrada filogenetskog stabla	31
3.10. Statistička obrada podataka.....	33
3. REZULTATI.....	34
4.1. Identifikacija bakterijskih izolata na temelju morfoloških i biokemijskih svojstava	34
4.2. Molekularna identifikacija izolata	41
4.3. Serotipizacija.....	41
4.4. Antimikrobna svojstva	43
4.4.1. Rezultati disk difuzijskog testa	43
4.4.2. Rezultati ispitivanja osjetljivosti testom mikrodilucije.....	51

4.5. Rezultati analize genoma	54
4.5.1. Rezultati sekvenciranja genoma	54
4.5.2. Rezultati analize prisutnih gena virulencije	57
4.5.3. Rezultati analize gena antimikrobne rezistencije.....	61
4.6. Filogenetska analiza.....	74
4. RASPRAVA.....	77
5. ZAKLJUČCI.....	87
6. LITERATURA	89
7. SAŽETAK	108
8. SUMMARY	110
9. ŽIVOTOPIS	112

POPIS KRATICA

ADH	arginin dihidrolaza
AMP	ampicilin
AMR	antimikrobna rezistentnost (engl. <i>Antimicrobial Resistance</i>)
AMY	amigdalin
ARA	arabinoza
ARG	geni rezistencije na antibiotike (engl. <i>Antibiotic Resistance Genes</i>)
ATCC	američka kolekcija kultura (engl. <i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenozin-trifosfat
bp	parovi baza (engl. <i>Base pair</i>)
BLAST	Alat za pretraživanje poravnanja (engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CARB	β -laktamaza koja hidrolizira karbenicilin (engl. <i>carbenicillin-hydrolyzing β-lactamase</i>)
CARD	Baza podataka o rezistentnosti na antibiotike (engl. <i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>)
CFU	broj jedinica bakterija koje formiraju kolonije (engl. <i>Colony-forming unit</i>)
chiA	hitinaza koja kodira protein (engl. <i>protein coding chitinase</i>)
CHL	kloramfenikol
CIT	citrat
CLSI	Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institut</i>)
CPS	kapsularni polisaharid
ctxA	kolera toksin (engl. <i>cholera toxin</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ENRO	enrofloksacin
EPC	izvanstanični proizvod (engl. <i>Extracellular products</i>)
EPS	izvanstanične polimerne tvari (engl. <i>Extracellular polymeric substances</i>)

EU	Europska unija
FAO	Organizacija za prehranu i poljoprivredu
FFN	florfenikol
flaC	Flagelarna C podjedinica (engl. <i>flagella C subunit</i>)
GC	guanin-citozinski sadržaj
GEL	želatinaza
GEN	gentamicin
GLU	glukoza
HGT	horizontalni prijenos gena (engl. <i>Horizontal Gene Transfer</i>)
hlyA	<i>E. coli</i> α -hemolizin (engl. <i>E. coli</i> α -hemolysin)
H ₂ S	sumporovodik
IND	indol
INO	inozitol
IUCN	Međunarodni savez za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava (engl. <i>The International Union for Conservation of Nature</i>)
kb	kilobaza
LDC	lizin dekarboksilaza
luxR	transkripcijski aktivator lux promotora (engl. <i>transcriptional activator of the lux promoter</i>)
MAN	manitol
McF	McFarland
MEL	melibioza
MERO	meropenem
MGE	pokretni genetski elementi (engl. <i>Mobile Genetic Elements</i>)
MIC	minimalana inhibitorna koncentracija (engl. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
ML	metoda najveće vjerovatnosti (engl. <i>Maximum Likelihood</i>)
MSHA	hemaglutinin osjetljiv na manozu (engl. <i>The mannose-sensitive haemagglutinin</i>)
NaCl	natrijev klorid
NaCOOCH ₃	natrij acetat

NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NO ₂	dušikov dioksid
OD	optička gustoća (engl. <i>Optical Density</i>)
ODC	ornitin dekarboksilaza
ONPG	beta – galaktozidaza
ONT	engl. <i>Oxford Nanopore Technologies</i>
OX	oksidaza
OXO	oksolinična kiselina
OXY	oksitetraciklin
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RHA	ramnoza
RGI	Identifikator gena rezistentnosti (engl. <i>Resistance Gene Identifier</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina
rRNA	ribosomalna RNA
RTX	ponavljanje u toksinu (engl. <i>Repeats-in-toxin</i>)
SAC	saharoza
SMX	sulfametoksazol
SOR	sorbitol
SP	serinska proteaza (engl. <i>Repeats-in-toxin</i>)
SXT	trimetoprim/sulfametoksazol
TAZ	ceftazidim
TCBS	Tiosulfat-citrat-žučne soli-saharozni agar (engl. <i>Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose</i>)
tcpA	toksinom koregulirani pilus (engl. <i>toxin-coregulated pilus</i>)
TDA	triptofan deaminaza
tdh	engl. <i>thermostable direct haemolysin</i>
toxR	termostabilan izravni hemolizin (engl. <i>regulatory gene controlling the expression of the genes</i>)
toxRVc	regulator avirulencije (engl. <i>avirulence regulator</i>)
trh	DH vezan hemolizin (engl. <i>TDH-related haemolysin</i>)

TSA	triptozna sojin agar (engl. <i>Trypticase soy agar</i>)
TSB	triptozna sojin bujon (engl. <i>Trypticase soy broth</i>)
T2SS1	sustav izlučivanja tipa II
T3SS1	sustav izlučivanja tipa III
UDP	uridin difosfat
UMP	uridin monofosfat
URE	ureaza
USD	američki dolar
vhh	gen za hemolizin (engl. <i>hemolysin gene</i>)
vhtml	gen za regulaciju transkripcije (engl. <i>transcriptional regulation</i>)
vhpA	gen koji kodira vhpA protein (engl. <i>gene encoding vhpA protein</i>)
vhs	<i>V. harveyi</i> sličan sifovirusu (engl. <i>V. harveyi siphovirus-like</i>)
vvh	hemolizin (engl. <i>Haemolysin</i>)
VAS	proteini sustava izlučivanja tipa IV
VFBD	Baza podataka faktora virulencije (engl. <i>Virulence Factor Database</i>)
VP	Voges-Proskauer
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija
zot	toksin zonule occludens (engl. <i>zonula occludens toxin</i>)

1. UVOD

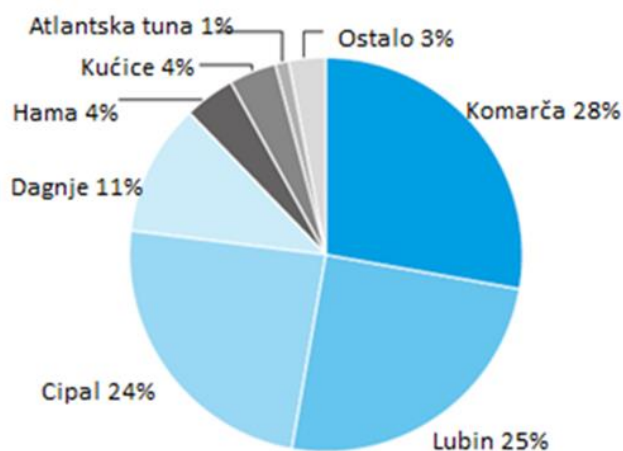
1.1. Akvakultura Sredozemlja

Uzgoj slatkovodne ribe u Sredozemlju započeo je prije mnogo stoljeća, dok se suvremeni uzgoj morske ribe učinkovito prakticira tek u posljednja četiri desetljeća (Rigos i sur., 2021). Akvakultura u Sredozemlju ima veliki gospodarski značaj i pokazuje stalan rast u posljednjih nekoliko desetljeća. Najveći udio proizvodnje, 98% otpada na uzgoj riba i školjkaša (Slika 1.). Uzgoj riba raste velikom brzinom u odnosu na školjkaše (Cascarano i sur., 2021). Trenutno u proizvodnji dominiraju dvije vrste riba, lubin (*Dicentrarchus labrax*) i komarča (*Sparus aurata*) s procijenjenom proizvodnjom od 200.000 odnosno 208.000 tona godišnje (FEAP, 2020; FAO, 2018; Carvalho i Guillen, 2021). Ove dvije vrste čine 53% od ukupne proizvodnje u marikulturi u Sredozemlju (Federation of Greek Mariculture, 2019) te su najzastupljenije nakon cipla. Grčka je glavni europski proizvođač s 51,1% proizvodnje lubina i 58,8% proizvodnje komarče, a slijede Španjolska (19,6% i 26,7%), Italija (7,9% i 9,1%) i Hrvatska (2,9% i 3,39%) (Seth-Smith i sur., 2016; FEAP, 2020). Uključujući neeuropske zemlje Tursku i Egipat, ovih šest država čini više od 90% ukupne sredozemne proizvodnje. Glavni potrošači lubina su Španjolska, Francuska, Italija, Grčka i Turska (Carvalho i Guillen, 2021), dok su glavni potrošači komarče Italija, Egipat, Tunis i Turska (Compassion in World Farming, 2021).

Posljednjih godina je sredozemna akvakultura postala raznolikija jer je započela s uzgojem drugih vrsta riba koje pokazuju potencijal za uzgoj (Cascarano i sur., 2021). Prekomjerni ribolov prirodnih zaliha ribe u posljednjih 30 godina uzrokovao je dramatično smanjenje mnogih vrsta te akvakultura igra važnu ulogu u zadovoljavanju stalne potražnje na tržištu (Papageorgiou, 2010).

Sredozemlje je poluzatvoreno more koje na južnoj obali (od Egipta do Maroka) graniči sa sušnim regijama (Millot i Taupier-Letage, 2005; Rodellas i sur., 2015). Posljednje, ali ne i najmanje važno, izgradnja Asuanske brane u Egiptu gotovo je presušila ušće rijeke Nil, nekadašnju najvažniju rijeku Sredozemnog mora, od koje vrlo malo vode sada dopire do Sredozemnog mora (Sharaf i El Din, 1977; Stanley, 1993; Abu-Zeid i El-Shibini, 1997). Manjak vode u Sredozemnom moru nadoknađuje se ulaskom vode iz Atlantskog oceana kroz Gibraltarski tjesnac (Bethoux, 1979; Farmer i Armi, 1988; Bethoux i Gentili, 1998; Millot i Taupier-Letage, 2005). Unatoč opskrbi atlantskom vodom, relativno bogatoj nutrijentima, nizak dotok rijeka odgovoran je za činjenicu da je Sredozemlje oligotrofno (siromašno hranjivim tvarima) ili visoko

oligotrofno more. Također ga karakterizira velika varijabilnost okoliša (salinitet, temperatura i slojevitost) koja ima tendenciju porasta prema istoku, unutar relativno ograničenog sredozemnog područja (Bethoux i sur., 1999; Turley, 1999; Lejeusne i sur., 2010; Rodellas i sur., 2015; Massa i sur., 2017). S obzirom na jedinstvena fizikalna i trofička svojstva Sredozemnog mora zanimljivo je vidjeti kako ti čimbenici utječu na osobitosti mikroorganizama.



Slika 1. Prikaz udjela proizvodnje ribe i školjkaša po količini u Sredozemlju. Preuzeto iz *Aquaculture in the Mediterranean Yearbook 2021*, Carvalho i Guillen (2021) i prilagođeno.

1.2. Značajne ribe koje se uzgajaju u Sredozemlju

1.2.1. Europski lubin

Europski lubin, *Dicentrarchus labrax* iz porodice *Moronidae* većinu svog života provodi u obalnim lagunama i estuarijima. Ova vrsta je eurihalna i euritermna, prilagođena različitim salinitetima i temperaturama što određuje njezinu široku geografsku rasprostranjenost od južne Norveške do Zapadne Sahare, duž Sredozemnog i Crnog mora (Haffray i sur., 2007; Pérez-Ruzafa i Marcos, 2014). Temperatura je glavni okolišni uvjet koji utječe na njegovu distribuciju i ponašanje. Temperatura također regulira migracije u dublja područja na otvorenoj obali zbog razmnožavanja i trajanje sezone mrijesta. Lubin je gonohoristička vrsta, što znači da je razdvojenih spolova, međutim ima nediferencirano spolno razdoblje tijekom prve godine života. Ženke se mrijeste u Sredozemnom moru zimi (od prosinca do ožujka) te imaju visoku plodnost. Prema Međunarodnom savezu za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava (engl. *The*

International Union for Conservation of Nature, IUCN) lubin nije ugrožena vrsta te predstavlja jednu od najrasprostranjenijih i najproduktivnijih vrsta riba na europskim obalama (Pérez-Ruzafa i Marcos, 2014).

1.2.2. Komarča

Komarča, *Sparus aurata* iz porodice *Sparidae* česta je riba u Sredozemnom moru te je prisutna duž istočne atlantske obale od Velike Britanije do Senegala (FAO, 2008). Uglavnom je mesožder i naseljava korita morske trave i pješčano dno, obično do dubine od oko 30 m. Komarča je hermafrodit; mrijest u području Sredozemlja počinje krajem prosinca, a traje do početka siječnja. Jako je osjetljiva na niske temperature (donja granica smrtnosti je 4°C), optimalna temperatura za njen uzgoj je od 18 do 26 °C pri kojima dostiže komercijalnu veličinu (350–400 g) za otprilike godinu dana. Prema Međunarodnom savezu za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava, IUCN komarča nije ugrožena vrsta.

1.3. Bolesti riba u akvakulturi Sredozemlja

Potražnja za hranom životinjskog porijekla ubrzano raste zbog stalnog rasta populacije i promjena u prehrani. Kako bi odgovorio na ovu rastuću potražnju, sektor akvakulture se pomaknuo prema intenzivnim proizvodnim sustavima. Pojave bolesti su usko grlo za industriju akvakulture u cijelom svijetu, odgovorne za ekonomske gubitke vrijedne milijarde američkih dolara godišnje (Bondad-Reantaso i Subasinghe, 2000). Riba iz uzgoja su zbog stresa povezanog s proizvodnjom podložnije zaraznim bolestima od divljih riba (Vedramin i sur., 2016). Intenzivna proizvodnja je osjetljivija na izbijanje bolesti nego ekstenzivni sustavi u kojima je nasad ribe niske gustoće (Tavornpanich i sur., 2019). Velika gustoća nasada dovodi do povećanja izravnog dodira među ribama i veće izloženosti stresu, što pogoduje razvoju bolesti (Diana, 2009; Lafferty i sur., 2015). Značajne bolesti koje utječu na uzgoj riba u Sredozemlju su vibrioze, tenacibakuloze, parazitoze i nodaviroza (Muniesa i sur., 2020).

1.4. Značaj vibrioza u akvakulturi Sredozemlja

U sredozemnoj akvakulturi, dominantni bakterijski uzročnici bolesti u proizvodnji lubina i komarče od osamdesetih godina 20. stoljeća su tradicionalno bili *Vibrio anguillarum* i *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, a danas su to *Vibrio harveyi*, *Tenacibaculum*

maritimum i *Vibrio alginolyticus* (Muniesa i sur., 2020; Rigos i sur., 2021). Komercijalna cjepiva su lako dostupna u posljednja dva desetljeća uglavnom za prevenciju bakterijskih infekcija *V. anguillarum* i *P. damsela* subsp. *piscicida* (Baliga i sur., 2018; Valderrama i sur., 2019), dok su cjepiva za ostale bakterije u razvoju.

Vibrioza je općenito naziv za sistemsku bakterijsku infekcija uzrokovanu bakterijama iz porodice *Vibrionaceae* (Mohamad i sur., 2019; Amaro i sur., 2020). Često se javlja kod divljih i uzgojenih morskih riba, a smatra se značajnim problemom koji izaziva gospodarske gubitke u sektoru akvakulture diljem svijeta (Mancuso i sur., 2015). Unutar porodice *Vibrionaceae*, važne vrste koje mogu izazvati bolest morske ribe u uzgoju su *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. ponticus* i *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Kim i Bang, 2008; Sandlund i sur., 2010; Haenen i sur., 2014; Bellos i sur., 2015; Liu i sur., 2018).

Vibrioze imaju izraženu sezonsku distribuciju u umjerenim krajevima, a uobičajno se javljaju u toplijem dijelu godine. Slijedom toga, povećanje temperature mora uzrokovano globalnim zatopljenjem pogoduje povećanju populacije ovih bakterija (Amaro i sur., 2020). Fluktuacija fizikalno-kemijskih svojstava mora i pregusti nasadi su među najznačajnijim čimbenicima koji dovode do izbijanja vibrioze u uzgoju riba (Kumar i sur., 2015). Ova bolest je ozbiljno utjecala na akvakulturu kozica porodice *Penaeus* na području Azije, uzrokujući značajan gospodarski gubitak od više od milijarde USD (Zorriehzahra i Banaederakhshan, 2015). Posljednjih godina opisani su gubici uzrokovani vibriozom u uzgoju raznih vrsta riba diljem svijeta (Mohi i sur., 2010; Khouadja i sur., 2013; Haenen i sur., 2014; Dong i sur., 2017; Krupesha-Sharma i sur., 2017; Rameshkumar i sur., 2017; Zhu i sur., 2018). Opsežna biološka i genetska raznolikost bakterija iz porodice *Vibrionaceae* u vodenom okolišu uvjetuje poteškoće u razumijevanju bolesti (Mohamad i sur., 2019).

1.5. *Vibrio harveyi*

Bakterije roda *Vibrio* spp. porodice *Vibrionaceae* su najčešći uzročnici bolesti akvatičnih životinja. Među ekonomski najznačajnima su predstavnici monofiletske skupine Harveyi (engl. *Harveyi clade*) kojem pripada jedanaest bakterijskih vrsta: *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. mytili*, *V. natrigens*, *V. azureus*, *V. sagamiensis*, *V. owensii* i *V. jasicida* (Urbanczyk i sur., 2013).

V. harveyi se smatra uvjetnim uzročnikom bolesti, obzirom da se najteži oblici bolesti javljaju kod imunosuprimiranih riba. Međutim, njegova uloga primarnog uzročnika bolesti postaje sve značajnija posljednjih godina (Amaro i sur., 2020).

1.5.1. Taksonomija

Bakterija *V. harveyi* je prvi put opisana kao *Achromobacter harveyi* (Johnson i Shunk, 1936) i imenovana po E. N. Harvey-u koji je proučavao luminiscenciju bakterija. Nakon toga je pripojena rodu *Lucibacterium* (Hendrie i sur., 1970), zatim rodu *Beneckea* (Reichelt i Baumann, 1973), a tek kasnije rodu *Vibrio* unutar porodice *Vibrionaceae* (Baumann i sur., 1981).

1.5.2. Etiologija

V. harveyi je Gram-negativna, štapićasta, blago zakrivljena bakterija čije dimenzije autori različito izvješćuju: $1,0-1,6 \times 0,5-0,7 \mu\text{m}$ (Buller, 2014.); $1,9-3,0 \times 1,2-1,4 \mu\text{m}$ (Shen i sur., 2017), $1,6-2,2 \times 1,0-1,1 \mu\text{m}$ (Tu i sur., 2017). Ova je bakterija aerobna ili fakultativno anaerobna, uvjetno patogena za akvatične životinje. Morska je bakterija koja se nalazi u morskim i u umjerenim i suptropskim područjima (optimalni temperaturni raspon između 18 i 25 °C) te tropskim zonama (oko 28 – 30 °C) (Austin i Zhang, 2006; Zhu i sur., 2018). Osim u morskom okolišu može se naći i u fiziološkoj crijevnoj mikroflori slobodno živućih morskih organizama (Ruby i Morin, 1979; Hernandez i sur., 2004).

1.5.3. Biokemijske i fiziološke osobitosti bakterije *V. harveyi*

Najčešće podloge koje se koriste za izdvajanje *V. harveyi* jesu tripton soja agar (TSA) s dodatkom 2% soli te Marine agar. Većina izolata izdvojena iz ribljih vrsta fermentira saharozu i pokazuje žućkastu boju na selektivnom i diferencijalnom mediju TCBS (engl. *Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose*). Pokretna je pomoću polarnih bičeva te ima oksidativni i fermentativni metabolizam, tvori oksidazu i katalazu. *V. harveyi* je halofilna bakterija i raste pri koncentraciji soli (NaCl) između 1-7%, u temperaturnom rasponu između 10 – 40 °C; nije zabilježen rast na 42 °C (Pretto, 2020).

Što se tiče metabolizma aminokiselina bakterije *V. harveyi* ne tvore arginin dihidrolazu, međutim tvore lizin i ornitin dekarboksilazu. Ne oslobađaju sumporovodik, ne iskorištavaju β -galaktozidazu, ne posjeduju triptofan deaminazu, tvore indol, Voges-Proskauerova reakcija je

negativna, ureaza može biti varijabilna. Inkubacija za potvrđivanje metabolizma želatinaze i citrata može potrajati od 48 do 72 sati (Buller, 2014). Metabolizam šećera može varirati u slučaju sorbitola i saharoze, dok fermentiraju glukozu, manozu i amigdalín. Ne fermentiraju inozitol, ramnozu, melibiozu i arabinozu (Pretto, 2020). Neki izolati pokazuju svojstvo bioluminiscencije, zbog enzima luciferaze koji oksidirajući organski spoj oslobađa energiju u obliku svjetlosnog zračenja u vidljivom spektru. Većina izolata izdvojenih iz kozica pokazuje luminescenciju *in vivo* i *in vitro*, dok neki izolati ne pokazuju luminescenciju *in vitro* već samo *in vivo*. *V. harveyi* može tvoriti α i β - hemolizu (Zhang i Austin, 2005; Buller, 2014; Petto 2018).

Bakterije *V. harveyi* izdvojene iz uzgojenog lubina u Sredozemnom moru, pokazivale su rezistentnost na određene antibiotike. Osjetljivost na florfenikol, tetraciklin, flumekin i trimetoprim/ sulfametoksazol uočena je u većini izolata. Zabilježena je rezistentnost na ampicilin i kolistin (Pretto, 2018).

1.5.4. Epidemiologija

Uzročnici vibrioza su ubikvitarni mikroorganizmi u akvatičnom okolišu. Bakterije su izdvojene iz koralja, riba, mekušaca, morskih cvjetnica, spužva, rakova i zooplanktona (Thompson i sur., 2004). *V. harveyi*, koji se prirodno javlja u morskim staništima (Firmino i sur., 2019; Zhang i sur., 2000), postao je značajan uzročnik bolesti kod divlje i uzgajane morske ribe i beskralježnjaka, osobito kozica iz porodice *Penaeus*. Tijekom devedesetih godina 20. stoljeća, *V. harveyi* je opisan kao uzročnik infekcija i mortaliteta s posljedičnim ekonomskim gubicima u akvakulturi Sjeverne Amerike (Alvarez i sur., 1998), Australije (Pizzuto i Hirst, 1995) i Azije (Jiravanichpaisal i sur., 1994). Zabilježeni su značajni mortaliteti u uzgoju larvalnih stadija tigraste kozice (*Penaeus monodon*) i kuruma kozice (*Penaeus japonicus*) koji su dostizali do 100% (Liu i sur., 1996). Austin i Zhang (2006) definiraju *V. harveyi* kao emergentnog uzročnika bolesti u globalnoj akvakulturi. Prepoznat je kao sve češći uzročnik bolesti uzgajanih riba u suptropskim područjima te je opisan kod kirnje (*Epinephelus awoara*) (Qin i sur., 2006), azijskog lubina (*Lates calcarifer*) (Tendencia, 2002), vrste pompano (*Trachinotus blochii*) (Pakingking i sur., 2018) te školjkaša i rakova (Karunasagar i sur., 1994; Lavilla-Pitogo i sur., 1998; Nishimori i sur., 1998). Nadalje, smatra se jednom od najznačajnijih patogenih bakterija u kineskoj akvakulturi (Cui i sur., 2014; Chen i sur., 2004; Zhang i sur., 2010). Ovu bakteriju je

teško iskorijeniti, a upotreba antibiotika može rezultirati razvojem antimikrobne rezistencije (Karunasagar i sur., 1994).

U Europi, posebice Sredozemlju, javlja se kao značajan uzročnik bolesti kod lista (*Solea* sp.) (Rico i sur., 2008) i lubina (Pujalte i sur., 2003). Isti autori potvrđuju da je *V. harveyi* jedna od najučestalijih *Vibrio* vrsta utvrđenih u morskoj vodi i školjkašima zapadnog Sredozemlja. Njihova istraživanja su pokazala da je prevalencija infekcije *V. harveyi* viša kod lubina nego komarče. Bolesti uzrokovana vrstom *V. harveyi* se češće javljaju u toplije doba godine, a u ostatku godine ih gotovo i nema.

1.5.5. Patogeneza

Neki izolati *V. harveyi* su visoko patogeni dok se drugi smatraju uvjetno patogenima. Brojna istraživanja patogenosti i virulencije ove bakterije dokazuju da oba svojstva ovise o soju bakterije i domaćinu (Austin i Zhang, 2006; Bai i sur., 2008; Zhang i Austin, 2000). Najpatogeniji sojevi mogu izazvati velike ekonomske štete u akvakulturi (Oakey i sur., 2003).

Nepoznat je točan put bakterije tijekom infekcije ribe, no pretpostavlja se da bakterija ulazi u ribu oralnim putem. Sposobna je proći želučanu barijeru, ući u crijeva i izazvati sistemsko oboljenje (Slika 2.). Izbijanju bolesti prethodi mnogostruko povećanje broja infektivnih čestica što pospješuje mogućnost širenja zaraze na veći broj jedinki u određenoj uzgojnoj jedinici (Austin i Zhang, 2006). Infekcija se odvija kroz tri stadija: 1. bakterija ulazi u tkivo domaćina pomoću kemotaktične pokretljivosti, 2. u tkivu domaćina bakterija razvija sustav za izdvajanje željeza iz tkiva domaćina, 3. bakterija oštećuje domaćina tvorbom izvanstaničnih tvari (engl. *Extracellular products*, ECP) (Themptander, 2005). Infekcija započinje u crijevu i krvotokom bakterije putuju u druge organe te na taj način uzrokuju generaliziranu infekciju i posljedičnu smrt ribe (Thompson i sur., 2004.).

A.



B.



Slika 2. Prikaz kliničke slike nakon infekcije uzrokovane bakterijom *Vibrio harveyi* kod lubina.

Vidljiva su krvarenja oko ustiju, po škržnom poklopcu te prsnim i trbušnim perajama (A) te krvarenja po crijevima (B).

1.5.6. Čimbenici virulencije

Svi čimbenici virulencije bakterije *V. harveyi* nisu još u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da su glavni čimbenici virulencije bičevi koji omogućavaju njenu pokretljivost, kapsula, prisutnost hidrofobnog površinskog antigena, sposobnost prijanjanja i infekcije epitelnih stanica domaćina, siderofori koji pomažu vezivanje željeza te izvanstanični proizvodi, posebno litički enzimi (hemolizini, serinske proteaze, metaloproteaze, cisteinske proteaze, hitinaze, fosfolipaze i lipaze) (Wang i Leung, 2000; Ruwandeepika i sur., 2012) kao i sposobnost stvaranja biofilma koja im omogućava rezistenciju na antibiotike i dezinficijense (Karunasagar i sur., 1994). Sposobnost bakterija da izvlače željezo iz stanica domaćina je ključna za njihovo preživljavanje (Ratledge i Dover, 2003). Jedan od najznačajnijih čimbenika virulencije je prijanjanje bakterije na površinu stanica domaćina koje je regulirano makromolekulama nazvanim adhezini. Bakterije iz porodice

Vibrionaceae prijanjaju uz kolagen, fibronektin, riblju sluz i epitelne stanice. Adhezija bakterija roda *Vibrio* nije još u potpunosti razjašnjena. Internalizacija i citotoksičnost su značajni faktori virulencije, a ekspresija adhezina može biti ovisna o okolišnim čimbenicima i o receptorima na stanicama domaćina (Wang i Leung, 2000). Gram-negativne štapičaste bakterije komuniciraju putem intracelularnog sistema koji je prvi puta otkriven na bakteriji *Vibrio fischeri* (Pesci i Iglewski, 2003). Međustanična komunikacija (engl. *Quorum Sensing*) omogućava bakterijama da djeluju kao grupa, a ne pojedinačno. *V. harveyi* emitira signal putem međustanične veze, a ti signali mogu biti od velike važnosti za određivanje osobina virulencije (Themptander, 2005). Pokazalo se da okolišni čimbenici, kao što su temperatura i salinitet imaju značajnu ulogu u virulenciji (Prayitno i Latchford, 1995; Mahoney i sur., 2010; Subramanian i Rosamma, 2013).

1.5.7. Geni virulencije

Komparativna analiza genoma otkrila je niz genomskih promjena (Makino i sur., 2003) koji mogu biti pokretačka snaga u evoluciji bakterije *V. harveyi* (Ochman i sur., 2000; Hacker i sur., 2003). Čini se da je horizontalni prijenos gena učinkovit mehanizam za uvođenje novih fenotipova u genom bakterija (Gogarten i sur., 2002). Nekoliko istraživanja ukazuje na horizontalni prijenos gena koji su ključni za virulenciju bakterija roda *Vibrio* (Shi i sur., 1998; Sechi i sur., 2000; Shinoda i Nakagawa 2004; Xie i sur., 2005; Bai i sur., 2008; Snoussi i sur., 2008).

Ruwandeeepika i sur. (2010) su istraživali prisutnost gena virulencije koji su prije opisani kod bakterija roda *Vibrio*, pripadnika *Harveyi* monofiletske skupne i drugih *Vibrio* bakterija. U svom istraživanju opisali su najčešće (tipične) gene virulencije bakterije *V. harveyi*: *luxR* (engl. *transcriptional activator of the lux promoter*), *toxR* (engl. *regulatory gene controlling the expression of the genes*), *vhpA* (engl. *gene encoding vhpA protein*), *chiA* (engl. *protein coding chitinase*), *SP* (engl. *serine protease*), *vhh* (engl. *hemolysin gene*), *vhml* (engl. *transcriptional regulation*), *vhs* (engl. *V. harveyi siphovirus-like*). Opisali su gene virulencije drugih *Vibrio* bakterija i to *zot* (engl. *zonula occludens toxin*), *toxRVc* (engl. *avirulence regulator*), *tcpA* (engl. *toxin-coregulated pilus*), *ctxA* (engl. *cholera toxin*) i *hlyA* (engl. *E. coli α-hemolysin*) prisutni kod *Vibrio cholerae*, *flaC* (engl. *flagella C subunit*) prisutni kod *V. anguillarum*, *tdh* (engl. *thermostable direct haemolysin*) i *trh* (engl. *TDH-related haemolysin*) prisutni kod *V. parahaemolyticus* i *vvh* (engl. *haemolysin*) prisutnog kod *V. vulnificus*. Istraživanjima su u svih

48 analiziranih izolata različitih vrsta roda *Vibrio* utvrdili prisutnost *luxR*, *toxRVh*, *vhpA*, *chiA*, serin proteazu i *vhh* gena virulencije tipičnih za bakterije Harveyi monofiletske skupine. Međutim gen *vhml* je bio prisutan samo kod jednog izolata, a gen *vhs* nije bio prisutan ni u jednom izolatu. Utvrđena je prisutnost gena virulencije drugih *Vibrio* bakterija, odnosno *hlyA* u 17% pretraživanih izolata, *toxRVc* u 23% pretraživanih izolata te *flaC* u 60% pretraživanih izolata. Niti jedan od analiziranih izolata nije sadržavao gene: *zot*, *ctxA*, *tcpA*, *trh*, *tdh* i *vvh*.

1.5.8. Serotipizacija

Serološke tehnike koje koriste poliklonske antiserume su poželjne za korištenje u epidemiološkim istraživanjima jer omogućavaju identifikaciju na razini serotipa. Izolati bakterije *V. harveyi* su serološki heterogeni, međutim postoje tri dominantna serotipa utvrđena u izolatima izdvojenih iz oboljelih riba: A, B i C. Precizna serološka identifikacija *V. harveyi* je važna u istraživanju bolesti morskih životinja jer pomaže u otkrivanju potencijalno virulentnih izolata (Amaro i sur., 2020).

1.5.9. Molekularna identifikacija

Primjenom modernih molekularnih tehnika kao što je sekvenciranje gena za 16S ribosomalnu RNA (*16S rRNA*) u identifikaciji vrste bakterijskih izolata (Ransangan i Mustafa, 2009) povećala se točnost dijagnoza. Gen *16S rRNA* je visoko konzerviran u eubakterijama i bitan za održivost stanice (Oakey i sur., 2003). Danas je gen *16S rRNA* najčešće korišten filogenetski genski biljeg u ekološkim studijama raznolikosti bakterija. Taj gen kodira dio RNA koja čini funkcionalni dio bakterijskog ribosoma. Sadrži očuvane dijelove koji omogućuju umnažanje gena pomoću PCR reakcije (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i potrebni su za ispravnu filogenetsku analizu, dok varijabilni dijelovi omogućuju da razlikujemo različite organizme i istražimo njihovu povezanost (Karst i sur., 2016). Gen *toxR* je prvi put otkriven kao pozitivan transkripcijski regulator *ctx* gena kojeg kodira kolera toksin (Miller i Mekalanos, 1984). Kasnije se pokazalo da *toxR* gen kodira transmembranski protein koji igra ključnu ulogu u regulaciji gena *ctx* i mnogih drugih gena (Crawford i sur., 1998). Važno je napomenuti da je lančana reakcija polimeraze (PCR) temeljena na genu *toxR* osjetljiva, tj. sposobna detektirati 4×10^3 stanica/ml, i specifična za *V. harveyi*, ali ne i druge bakterije roda *Vibrio* (Pang i sur., 2006). Gen *vhhP2* koji kodira protein vanjske membrane nepoznate funkcije identificiran je kod patogenih izolata *V. harveyi*.

Razvijena je jednostavna metoda lančane reakcije polimeraze za identifikaciju vrste *V. harveyi* na temelju konzervirane sekvence gena *vhhP2*. Pokazalo se da je ova metoda brza i specifična za otkrivanje *V. harveyi* iz životinjskih uzoraka i uzoraka okoliša iako su neki izolati bakterije *Vibrio campbellii* unakrižno reagirali i pogrešno su identificirani kao *V. harveyi* (Cano-Gomez i sur., 2009).

Umnožavanjem domaćinskog gena (engl. *housekeeping gene*) *pyrH* koji kodira uridin monofosfat kinazu (UMP kinaza) koja sudjeluje u biosintezi pirimidina UDP (Voet i Voet, 2004) može se potvrditi identifikacija izolata na razini vrste kroz usporedbu sa sekvencama dostupnim u literaturi (Pretto, 2020). Zabilježen je uspjeh za multipleks PCR, koji je bio i specifičan i osjetljiv za detekciju bakterija *Edwardsiella tarda*, *V. harveyi*, *V. anguillarum* i *V. alginolyticus* (Pinto i sur., 2017).

1.5.10. Svojstva genoma bakterije *V. harveyi*

Wang i suradnici (2015) su prvi sklopili cijeli genom ove bakterije te je analiza genoma pokazala da *V. harveyi* ima dva kružna kromosoma. Kromosom 1 sadrži: 3,621,606 baznih parova (engl. *base pares*, bp), kromosom 2: 2,259,884 bp, a veličina cijelog genoma je 5,881,490 bp (44.9% guanin-citozinski sadržaj, GC). Identificirane su 5.133 kodirajuće sekvence, od kojih je za 825 predviđeno da kodiraju hipotetske proteine. Utvrđeno je da genom sadrži superintegron od 97,5 kbp, 3 integrirana profaga ili ostatka faga, 12 rRNA operona, 7 transpozaza i 0 retrona. Također su pronađeni geni koji kodiraju sustave sekrecije tipa II, III, IV i VI, lateralni i polarni flagelarni sustav, sintezu polihidroksibutirata, bioluminescenciju i proteina povezanih s međustaničnom komunikacijom.

1.5.11. Antimikrobna rezistentnost

Kontinuirana primjena antibiotika u akvakulturi dovela je do njihove sveprisutnosti u okolišu (Gao i sur., 2012). Bakterije rezistentne na antimikrobne lijekove mogu razviti u okolišnim organizmima rezervoar gena rezistentnih na antibiotike (engl. *Antibiotic Resistance Genes*, ARGs). Sustavi akvakulture promatraju se kao potencijalna žarišta gena antimikrobne rezistencije (engl. *Antimicrobial Resistance*, AMR) (Watts i sur., 2017). Prijenos patogena rezistentnih na antimikrobne lijekove iz okoliša mogao bi dovesti do pojave antimikrobne rezistencije i kod divljih i uzgojenih riba. Ove spoznaje treba uzeti u obzir jer izravna potrošnja

riba se može negativno odraziti na ljudsko zdravlje (Cizek i sur., 2010). Budući da se neke antimikrobne tvari koje se koriste u akvakulturi koriste i u humanoj medicini, primjena antimikrobnih tvari u akvakulturi ozbiljno utječu na razvoj antimikrobne rezistencije u drugim ekološkim nišama (Heuer i sur., 2009).

Objavljena istraživanja o procjeni rezistencije na antimikrobne tvari bakterije *V. harveyi* prilično su oskudna. Istraživanje provedeno na patogenom izolatu izdvojenom iz hibrida škarpine (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) (Shen i sur., 2017) u jugoistočnoj Aziji pokazalo je višestruku rezistenciju na peniciline (penicilin, oksacilin, ampicilin, karbenicilin, piperacilin), cefalosporine (cefaleksin, cefazolin, cefradin, cefuroksim, ceftazidin, cefoperazon), aminoglikozide (gentamicin, kanamicin, neomicin), tetraciklin i eritromicin pokazujući osjetljivost isključivo na monociklin, doksiciklin i ceftriakson. Testiranje osjetljivosti na antimikrobne tvari provedeno disk difuzijskom metodom na širokom spektru antimikrobnih sredstava i na tridesetak izolata *V. harveyi* izdvojenih iz različitih kineskih provincija u istom hibridu škarpine (Zhu i sur., 2018) potvrdili su rezistentnost na molekule koje pripadaju penicilinima (penicilin, oksacilin, ampicilin, karbenicilin, amoksicilin), polipeptidima (virginiamicin, polimiksin B), linkomicinima (linkomicin, klindamicin), acetilspiramicinu, streptomycinu i bacitracinu u 90-100% izolata. Promjenjive rezistencije otkrivene su na rifampicin (23,3% ispitanih izolata), kanamicin (16,7%), tetraciklin i doksiciklin (26,7%) te sulfametoksazol-trimetoprim (30,3%). Tumačenje prisutnosti zone inhibicije temeljilo se na kategorizaciji u 5 razina na temelju promjera (mm) za sve analizirane antimikrobne tvari (Zhu i sur., 2018). Testiranje osjetljivosti provedeno na dva izolata izdvojena iz morske vode, uzorkovana u blizini farmi školjkaša u Koreji (Kang i sur., 2014), pokazalo je rezistentnost na ampicilin, cefotaksim, cefotetan, cefalotin, cefepim, streptomycin i vankomicin; srednju osjetljivost na eritromicin, gentamicin, kanamicin, rifampicin, nalidiksičnu kiselinu te, osjetljivost na kloramfenikol, ciprofloksacin, tetraciklin i sulfametoksazol trimetoprim. Općenito, bakterije mogu posjedovati urođene gene rezistencije na antimikrobne tvari u kromosomima ili steći gene rezistentnosti putem plazmida (Davison i sur., 2000; Loo i sur., 2020). Genetski elementi kao što su plazmidi prenose se na druge bakterije horizontalnim ili vertikalnim prijenosom gena. Sveprisutnost *Vibrio* vrsta u vodenim životinjama predstavlja mogući rizik za ljude jer su ove bakterije rezistentne na više lijekova te se rezistentnost može prenijeti izravno na ljude putem konzumacije morskih plodova (FAO, 2006). Bakterije iz roda *Vibrio* sp. su nositelji

urođene rezistentnosti na antibiotike iz porodice karbenicilin - hidrolizirajućih β -laktamaza (engl. *carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase*, CARB), te pokazuju rezistentnost na ampicilin (Chiou i sur., 2015; Costa i sur., 2021).

1.5.12. Prevencija i liječenje

Dobra proizvođačka praksa koja podrazumijeva optimalne uvjete u uzgojnim jedinicama (kvalitetu vode, zasićenost kisikom, gustoću nasada, manipuliranje ribom) kao i primjena mjera biosigurnosti je veoma važna u sprječavanju ulaska uzročnika bolesti u ribogojilište i širenja na sve uzgojne jedinice. S obzirom da to nije uvijek moguće, a da bi se spriječili visoki mortaliteti, u nekim je slučajevima jedino rješenje primjena antibakterijskih tvari u hrani. Međutim, njihovo korištenje i uspješnost primjene je ograničeno jer bolesne ribe najčešće ne uzimaju hranu (Inglis i sur., 1993). Bakterije roda *Vibrio* sp. osjetljive su na širok raspon kliničkih antibiotika uključujući tetraciklin, kloramfenikol, cefalosporine treće generacije (ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson), trimetoprim–sulfametoksazol, gentamicin, levofloksacin i ciprofloksacin (Stevens i sur., 2014; Elmahdi i sur., 2016). Podaci o liječenju infekcija *V. harveyi* u lubina još su ograničeni, ali se primjena potenciranog sulfonamida pokazala učinkovitom (Pretto, 2018). Nažalost, opisano je da se dio lijekova primjenjenih u hrani iz ekskrementa ili iz nekonsumirane hrane taloži u sedimentu i predstavlja potencijalnu opasnost za razvoj antimikrobne rezistencije (Mary i sur., 2004).

Sve opisane činjenice ističu važnost primjene alternativnih mogućnosti liječenju antimikrobnim tvarima, kao što je poticanje nespecifičnog i specifičnog imunskog odgovora. Cijepljenje je jedan od mogućih i učinkovitih načina borbe protiv bolesti te se tako sprječava pojava bolesti u akvakulturi i reduciraju gubici uzrokovani bolešću te smanjuje upotreba antibiotika. Produžavanje zaštitnog djelovanja može se postići dodatkom pomoćnih tvari (adjuvansa) bakterinima. Cjepiva na bazi inaktiviranih bakterija su se pokazala djelotvornim, pa je većina bakterijskih cjepiva koja se koriste u akvakulturi inaktivirano (Nguyen i sur., 2017). Nakon prve primjene bakteriofaga u liječenju infekcije gofa bakterijom *Lactococcus garviae* u Japanu (Nakai i sur., 1999), provedeni su brojni pokusi liječenja bakterijskih infekcija ovom metodom (Kalatzis i sur., 2016; Kalatzis i sur., 2018). Lazado i sur. (2011) testirali su primjenu dviju probiotskih bakterija sa svojstvom adherencije i utvrdili da one interferiraju sa svojstvom adherencije patogenih bakterija smanjujući mogućnost infekcije.

2. CILJEVI RADA

1. Utvrditi sličnosti i razlike biokemijskih i seroloških karakteristika izolata *V. harveyi* izdvojenih iz uzgojenih riba lubina i komarče u različitim djelovima Sredozemlja.
2. Sekvenciranjem različitih izolata bakterija *V. harveyi* identificirati sličnosti i razlike u sastavu gena virulencije neophodnih za razumijevanje patogenosti.
3. Ispitano je prisustvo poznatih gena antimikrobne rezistencije u istraživanim izolatima bakterije *V. harveyi* i uspoređeno s rezultatima dobivenim određivanjem osjetljivosti prema antimikrobnim sredstvima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Odabir izolata

Istraživanje je provedeno na 39 izolata bakterije *V. harveyi* (Tablica 1.). Izolati bakterija korišteni u ovom istraživanju izdvojeni su iz oboljelih lubina i komarči na uzgajalištima ribe na nekoliko lokaliteta uz hrvatsku obalu Jadrana, a dio izolata je dobiven od suradničkih institucija iz zemalja Sredozemlja: Italije, Francuske, Španjolske, Tunisa, Cipra i Turske (Slika 3.).

Tablica 1. Prikaz izolata bakterije *V. harveyi* korištenih za potrebe ovog istraživanja i njihova geografska pripadnost.

Izolat	Vrsa ribe	Porijeklo ribe
FR-1	Lubin	Francuska
FR-2*	Lubin	Cipar
FR-3	Lubin	Francuska
FR-4	Komarča	Francuska
FR-5*	Lubin	Tunis
FR-6	Komarča	Francuska
FR-7	Komarča	Francuska
FR-8	Komarča	Francuska
FR-9	Lubin	Francuska
FR-10	Komarča	Francuska
ESP	Komarča	Španjolska
TR-2	Komarča	Turska
IT-1	Lubin	Italija (Tirensko more)
IT-2	Lubin	Italija (Jonsko more)
IT-3	Lubin	Italije (Jadransko more)
IT-4	Lubin	Italija (Tirensko more)
IT-5*	Lubin	Turska
IT-6	Komarča	Italija (Jadransko more)
IT-7	Lubin	Italija (Tirensko more)
IT-8	Lubin	Italija (Jadransko more)
94/17	Lubin	Hrvatska (Jadransko more – srednj dio)
164/18	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
166/18	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
120/19	Komarča	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
127/18	Komarča	Hrvatska (Jadransko more - sjeverni dio)
160/19	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
101/17	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
126/17	Komarča	Hrvatska (Jadransko more - sjeverni dio)
112/19	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - sjeverni dio)

115/19	Komarča	Hrvatska (Jadransko more - sjeverni dio)
133/20	Komarča	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
225/20	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
121/21	Komarča	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
327/21	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
335/21	Komarča	Hrvatska (Jadransko more – sjeverni dio)
A2	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
A27	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
A32	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)
A39	Lubin	Hrvatska (Jadransko more - srednji dio)

*izolati su označeni oznakom zemalja iz koje potječe suradni laboratorij koji nam je prepustio izolate iz zemalja navedenih u tablici



Slika 3. Prikaz geografske karte Sredozemlja i lokacija uzorkovanja. Preuzeto i prilagođeno iz: https://hr.wikipedia.org/wiki/Sredozemno_more.

Četiri izolata (A2, A27, A32 i A39) uključena u istraživanje su dobivena iz crijeva klinički zdrave ribe. Svi su izolati nakon izdvajanja iz uzgajanih lubina i komarči i preliminarnu identifikaciju bili pohranjeni na -80 °C u Laboratoriju za patologiju riba Hrvatskog veterinarskog instituta do početka daljnjih istraživanja.

3.2. Izdvajanje bakterija

Za bakteriološku pretragu oboljelih uzoraka lubina i komarče korišteni su uzorci materijala iz srca, slezene, prednjeg bubrega i očiju lubina i komarče. Nakon aseptičnog otvaranja trbušne šupljine oboljele ribe, užarenim skalpelom opaljena je površina srca, slezene i prednjeg bubrega. Materijali su uzeti sterilnim bakteriološkim uškama ispod opaljenog područja. Nakon toga su

pažljivo odmaknuti trbušni organi i riblji mjehur te su na isti način uzeti uzorci bubrega. Materijali iz oka su uzeti tako da je najprije užarenim skalpelom opaljena površina oka, a potom je podvlačenjem sterilne uške ispod opaljenog dijela uzet materijal za nasađivanje na bakteriološku podlogu. Materijali iz crijeva zdravih riba su uzeti sterilno, kroz opaljenu stijenku, iz lumena crijeva ribe. Svi materijali su nasađeni na hranjive bakteriološke podloge tripton soja agar - TSA (Sigma-Aldrich, Njemačka) uz dodatak 1,5% soli i Marine Agar, MA (Condalab, Španjolska), te inkubirani na 23 ± 2 °C tijekom 24 do 48 sati. Nakon što su bakterijske kolonije porasle na bakteriološkim podlogama bile su presađene razrjeđivanjem na MA (Condalab, Španjolska) te su dobivene izdvojene, pojedinačne bakterijske kolonije.

Te bakterijske kolonije su po svojim morfološkim osobinama odgovarale opisanim kolonijama vrste *V. harveyi* (Austin i Austin, 2012), a identificirane su određivanjem fizioloških i biokemijskih svojstava te pohranjene na kuglice za smrzavanje bakterijskih kolonija CryoInstant medij (Deltalab, Španjolska) na temperaturu -80 °C do nastavka daljnjih istraživanja.

Prije početka istraživanja bakterijski izolati su odmrznuti i presađeni na MA (Condalab, Španjolska) te inkubirani na 23 ± 2 °C tijekom 24 do 48 sati.

3.3. Morfološke karakteristike kolonija

Nakon inkubacije materijala na hranjivim podlogama pregledane su izrasle bakterijske kolonije. Nakon dobivanja čistih bakterijskih kultura, na obrnutom mikroskopu pregledane su pojedinačne kolonije i utvrđena njihova morfologija.

Iz čiste kulture je napravljen razmaz tako što je na čistu predmeticu stavljena kap fiziološke otopine i u tu kap bakteriološkom uškom dodana mala količina bakterijskih stanica iz kolonije. Razmaz je napravljen kružnim pokretima bakteriološkom uškom po predmetnom stakalcu i ostavljen da se osuši na sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije toplinom bakterija su obojene bojenjem prema Gramu (Biognost, Hrvatska) kojim se bakterije diferenciraju na Gram-pozitivne i Gram-negativne.

3.4. Biokemijska identifikacija izolata

3.4.1. Utvrđivanje pokretljivosti

Pokretljivost bakterija je određena primjenom API M Medium ampula (BioMerieux, Francuska). Prije inokulacije bakterijskim kolonijama, ampule su zagrijane u vodenoj kupelji u kipućoj vodi

10 minuta. Nakon toga su ohlađene u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi. Čiste kolonije koje nisu bile starije od 24 sata s bakteriološke podloge su uškom prenesene u medij ampule. Kolonije su inokulirane kroz 2/3 visine medija. Potom je ampula zatvorena i inkubirana 24 sata na 28 °C. Nakon inkubacije su očitani rezultati. Pokretne bakterije difundiraju s linije inokuluma i migriraju kroz medij te on postaje zamućen. Kod nepokretnih bakterija rast je ograničen na liniju inokuluma i medij ostaje proziran.

3.4.2. Oksidacijsko-fermentacijska svojstva

Oksidativni i fermentativni metabolizam bakterijskih izolata su testirani pomoću OF Medium (BioMerieux, Francuska). Ampule s medijem su zagrijane u vodenoj kupelji u kipućoj vodi 10 minuta. Nakon toga su ohlađene u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi. Za svaki ispitivani izolat korištene su dvije ampule. Medij je inokuliran ubodom uške na otprilike 1 cm od dna ampule, a za inokulaciju su korištene 24-satne čiste bakterijske kolonije. U jednu epruvetu je nasloženo sterilno parafinsko ulje. Obje epruvete su inkubirane na 28 °C tijekom 24 sata nakon čega su očitani rezultati. Ako se pojavi žuta boja u ampuli u koju nije dodano sterilno parafinsko ulje smatra se da bakterija posjeduje oksidativni metabolizam. Ukoliko se pojavi žuta boja i u ampuli u koju nije dodano sterilno parafinsko ulje i u ampuli u koju je ono dodano, smatra se da bakterija ima i oksidativni i fermentativni metabolizam. Ako u ampuli medij ostane homogene zelene boje smatra se da nije došlo do reakcije. Ako medij postane plavi, to ukazuje na alkalizacijsku aktivnost mikroorganizma i treba se protumačiti kao izostanak oksidativnog i fermentativnog metabolizma.

3.4.3. Citokrom-oksidaza

Dokazivanje tvorbe enzima citokrom oksidaze je provedeno pomoću reagensa za utvrđivanje oksidaze (Becton, Dickinson i Company, SAD). Postupak je proveden tako što je na traku filter papira kapnuta kap reagensa (Becton, Dickinson and Company, SAD), uškom je bakterijska kolonija s agara prenesena na filtarski papir i utrljana. Nakon 20 do 60 sekundi je utvrđeno da li je došlo do promjene boje. Ukoliko bakterija tvori enzim citokrom oksidazu razvila se ljubičasta reakcija.

3.4.4. Određivanje katalaze

Proizvodnja enzima katalaze ispitana je tako da je uškom uzeto nekoliko bakterijskih kolonija s agara i preneseno na predmetno stakalce. Potom je dodana 1 kap otopine vodikovog peroksida (Merck, Njemačka) uz uzastopne kružne pokrete uškom. Izolati koji tvore enzim katalazu počinju oslobađati mjehuriće kisika.

3.4.5. Određivanje tipa hemolize

Tip hemolize određivan je tako da su bakterijski izolati nasađeni na krvni agar (5% ovčje krvi) s dodatkom 1,5% soli tijekom 24 sata na 23 ± 2 °C. Nakon što su bakterijske kolonije izrasle utvrđen je tip hemolize. Ukoliko bakterijske kolonije izlučuju enzime koji samo djelomično razgrađuju eritrocite radi se o α – hemolizi i tada je bakterijska kolonija okružena zelenkastim područjem koje tvore razgrađeni eritrociti. Ako je došlo do potpune razgradnje eritrocita vidljivo je jasno područje koje okružuje bakterijsku koloniju i govori se o β – hemolizi. U slučaju da nije vidljiva hemoliza radi se o γ – hemolizi (Barnett, 1989).

3.4.6. Sposobnost rasta na različitim temperaturama

Sposobnost rasta na različitim temperaturama ispitana je tako da su bakterijski izolati nasađeni u epruvete napunjene s 3 ml Trypticase soy bujona – TSB (Becton, Dickinson and Company, SAD) uz dodatak 2% soli i inkubirani tijekom 24 – 48 sati na temperaturama od 4 °C, 15 °C, 23 °C i 37 °C.

3.4.7. Sposobnost rasta u različitim koncentracijama soli

Sposobnost rasta u različitim koncentracijama soli je određena tako da su bakterijski izolati nasađeni u 3 ml peptonske vode koja je dobivena otapanjem 8 g peptona (Biolife, Italija) u 1000 ml destilirane vode uz dodatak 0,5%, 3%, 6% i 10% soli. Količina bakterijskih kolonija koja je korištena je jedna bakteriološka uška (1 μ l) po uzorku. Suspenzije su zatim inkubirane na 23 ± 2 °C tijekom 24 – 48 sati. Nakon inkubacije izmjerene su optičke gustoće (engl. *Optical Density*, OD) svake suspenzije pomoću denzitometra DEN-1 (Kisker Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka).

3.4.8. Određivanje biokemijskih svojstava koristeći testni komplet API 20E

Za određivanje biokemijskih svojstava, umjesto pojedinačnog određivanja biokemijskih svojstava, korišteni su gotovi biokemijski nizovi za identifikaciju bakterija.

Korišten je komercijalni testni komplet API 20E (BioMerieux, Francuska) koji se sastoji od 20 mikro cjevčica ispunjenih dehidriranim supstratima. Ovim testom ispituje se enzimatska svojstva i to prisustvo enzima β -galaktozidaze (ONPG), enzima koji dehidriliraju aminokiseline arginin, lizin, ornitin, citrat, tvore sumporovodik, indol, Voges Proskauerov test koji dokazuje tvorbu acetoina, hidrolizu uree, razgradnju želatine, fermentaciju ili oksidaciju šećera glukoze, manoze, inozita, sorbita, ramnoze, saharoze i melobiza te, amigdalina i arabinozu, i tvorbu nitrita. Svaka jažica ovog testa inokulirana je bakterijskom suspenzijom koja je dobivena tako što je u 5 ml sterilne 0,85% fiziološke otopine suspendirana 24-satna izolirana bakterijska kolonija. Testovi su popunjeni pomoću sterilne pipete tako da je bakterijska suspenzija dodana u cjevčice i kupole testova označenih oznakom CIT, VP i GEL. Ostale jažice su popunjene samo do razine cjevčica. U kupole testova označenih oznakom ADH, LDC, ODC, H₂S, URE ukapano je sterilno mineralno ulje kako bi se stvorili anaerobni uvjeti. Zatvorena je inkubaciona komorica te je test inkubiran uz modifikaciju temperature inkubacije u odnosu na preporuke za korištenje testa na 28 ± 2 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije zabilježeni su rezultati svih reakcija i dodani reagensi u testove koji su to zahtjevali. Dodan je TDA reagens u jažicu koja je označena oznakom TDA da se utvrdi posjeduju li izolati enzim triptofan deaminazu te je praćena promjena boje. U jažicu s oznakom IND dodana je kap James reagensa kako bi se odredila mogućnost izolata da razgradi amniokiselinu triptofan u indol. U jažicu s oznakom VP dodana je kap VP1 i VP2 reagensa da se ispita tvorba acetoina te je praćena promjena boja. Bakterijski izolati su identificirani na osnovi usporedbe numeričkog profila s bazom podataka za akvatične bakterije (Buller, 2014).

3.5. Molekularna identifikacija

3.5.1. Izdvajanje DNA iz bakterijskih kolonija

Genomska deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je izdvojena iz bakterijskih kolonija korištenjem komercijalnog kompleta za izdvajanje DNA „NucleoSpin® Microbial DNA“ (Macherey-Nagel, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Čiste bakterijske kolonije su suspendirane u tubici s 100 µl pufera BE (pufer za eluiranje). Suspenzija je prebačena u NucleoSpin®Bead Tube Type B tubicu i dodano je 40 µl pufera MG (pufer za liziranje) i 10 µl proteinaze K. Uzorci su potom homogenizirani (SpeedMill PLUS, AnalytikJena, Njemačka) na 30 Hz (herca) tijekom 5 minuta i centrifugirani (Microspin 12, Grant Instruments, Velika Britanija) na 11.000 okretaja tijekom 30 sekundi. Nakon dodavanja 600 µl pufera MG uzorci su ponovno centrifugirani. Nakon centrifugiranja, 550 µl supernatanta je prebačeno u tubice sa silikatnim kolonama (NucleoSpin® Microbial DNA Column) i potom centrifugirano. Silikatne kolone su dva puta isprane dodavanjem 500 µl otopine BW (pufer za ispiranje) i B5 (koncentrirani pufer za ispiranje) i potom centrifugirane. U završnom koraku izdvajanja DNA u tubice sa silikatnim kolonama dodano je 100 µl pufera BE, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 1 minute i potom centrifugirani. Izdvojena bakterijska DNA je do daljnje uporabe pohranjena na 4 °C u Laboratoriju za patologiju riba, Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu.

3.5.2. Umnažanje odsječka *16S rRNA* gena

Lančana reakcija polimerazom korištena je kako bi se umnožio ciljani odsječak *16S rRNA* gena duljine 1400 bp te, kako bismo potvrdili pripadnost rodu *Vibrio* i procijenili je li uzorak prikladan za daljnju molekularnu analizu. Korištena je prednja početnica 27FYM (5'-143 AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') (Frank i sur., 2008.) i stražnja početnica 1492YR (5'-TACGG44GACT3TT) (Newby i sur., 2004).

Tablica 2. Prikaz uvjeta PCR reakcije za umnažanje odsječka gena *16S rRNA*

Gen/bp	Početna aktivacija enzima (°C/vrijeme)	Broj ciklusa	Denaturacija (°C/vrijeme)	Faze ciklusa			Završno produljenje (°C/vrijeme)	Zaustavljanje reakcije
				Sparivanje početnica (°C/vrijeme)	Produljenje (°C/vrijeme)			
16S rRNA 1400 bp	95°C/2 min	35	94°C/1 min	49°C/30 s	72°C/2 min	72°C/5 min	4°C	

Za izvođenje PCR reakcija korišten je komplet GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, SAD). Reakcijska smjesa je sadržavala: 10 µl GoTaq G2 Hot Start Master Mixa, DNA početnice (0,5 µM svaka) i vode bez nukleaze do konačnog volumena od 20 µl. Ukupnom volumenu reakcijske smjese od 20 µl dodano je 2 µl DNA kalupa koncentracije 100 ng DNA mjereno na spektrofotometru serije DS-11 (DeNovix, SAD). Za sigurnost i kontrolu kvalitete rada upotrijebljene su pozitivna i negativna kontrola. Reakcija je izvedena korištenjem ProFlex™PCR System (Applied Biosystems, SAD) toplokružnika s početnom aktivacijom enzima 2 minute na 95 °C. Nakon toga je slijedilo 35 ponavljajućih ciklusa: 1 minuta denaturacije na 94 °C, 30 sekundi sparivanje početnica na 49 °C, 2 minute produljenje na 72 °C, a nakon posljednjeg ciklusa slijedilo je završno produljenje 5 minuta na 72 °C, te hlađenje uzoraka na +4 °C (Tablica 2.).

3.5.3. Umnažanje odsječka *toxR* gena

Nakon što je identificiran rod izdvojenih bakterija, izveden je drugi PCR koristeći iste uzorke DNA, kako bi utvrdili da bakterije pripadaju vrsti *V. harveyi*. U tu svrhu umnožen je odsječak gena *toxR* koristeći prednje početnice toxRF1 (5'- GAAGCAGCACTCACCGAT-3') i stražnje početnice toxRR1 (5'- GGTGAAGACTCATCAGCA -3') (Pang i sur., 2006). Očekivana veličina dobivenih produkata je 382 bp.

Za izvođenje PCR reakcija korišten je komplet GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, SAD). Reakcijska smjesa je sadržavala: 10 µl GoTaq G2 Hot Start Master Mixa, DNA početnice (0,5 µM svaka) i vode bez nukleaze do konačnog volumena od 20 µl. Ukupnom volumenu reakcijske smjese od 20 µl dodano je 2 µl DNA kalupa koncentracije 100 ng DNA mjereno na spektrofotometru serije DS-11 (DeNovix, SAD). Za sigurnost i kontrolu kvalitete rada upotrijebljene su pozitivna i negativna kontrola. Reakcija je izvedena korištenjem ProFlex™PCR System (Applied Biosystems, SAD) toplokružnika s početnom aktivacija enzima 2 minute na 95 °C. Nakon toga je slijedilo 35 ponavljajućih ciklusa: 1 minuta denaturacije na 94 °C, 30 sekundi sparivanje početnica na 55 °C, 1 minuta produljenje na 72 °C, a nakon posljednjeg ciklusa slijedilo je završno produljenje 1 minutu na 72 °C, te hlađenje uzoraka na +4 °C (Tablica 3.).

Tablica 3. Prikaz uvjeta PCR reakcije za umnažanje odsječka gena *toxR*

Gen/bp	Početna	Broj ciklusa	Faze ciklusa			Završno	Zaustavljanje reakcije
	aktivacija enzima (°C/vrijeme)		Denaturacija (°C/vrijeme)	Sparivanje početnica (°C/vrijeme)	Produljenje (°C/vrijeme)	produljenje (°C/vrijeme)	
<i>toxR</i> 382 bp	95°C/m2min	35	94°C/ 1min	55°C/ 30s	72°C/ 1min	72°C/ 1min	4°C

3.5.4. Određivanje nukleotidnih slijedova gena

Uspješnost umnažanja provjerena je vizualizacijom korištenjem kapilarne elektroforeze QIAxcel-om (Qiagen, Njemačka) pomoću DNA Screening kompleta (Qiagen, Njemačka) te biljega veličine (50 bp -1,5 kb/ 100 pb – 2,5 kb; QX DNA Size Marker, Qiagen) i biljega za poravnanje (15 pb – 3 kb; QX Alignment Marker, Qiagen). Zbog određivanja nukleotidnih slijedova umnoženi odsječci pročišćeni su dodavanjem 2 µl ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems, SAD) prema uputama proizvođača. Potom su inkubirani u toplokružniku na 37 °C kroz 15 minuta kako bi se razgradio višak početnica i nukleotida te, na 80 °C kroz 45 minuta da se inaktivira ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent.

PCR produkti iz obje PCR reakcije su nakon pročišćavanja poslani u kompaniju Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska) zbog određivanja nukleotidnih slijedova u oba smjera. Dobiveni nukleotidni slijedovi poravnani su računalnim programom Geneious Prime 2019.2 (Biomatters, New Zealand) i uspoređeni s dostupnim nukleotidnim slijedovima pohranjenima u banci gena (GenBank®), koja je pretražena pomoću programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®).

3.6. Serotipizacija

3.6.1.1. Priprema antigena za imunizaciju

Bakterijski izolati korišteni za imunizaciju pokusnih kunića uzgajani su u bujonu s dodatkom 1% soli tijekom 18 – 24 h. Nakon što su se bakterije umnožile inaktivirane su 2% (vol/vol) otopinom formaldehida (40%). Za imunizaciju su korišteni samo izolati koji nisu pokazali autoaglutinaciju nakon zagrijavanja tijekom 1 sata na 120 °C (Sørensen i sur., 1986).

3.6.1.2. Antiserumi

Kunićima je intravenozno ubrizgana suspenzija formalinom inaktiviranih bakterijskih stanica (engl. *formalin killed cells*) ispranih fiziološkom otopinom ($\sim 10^9$ stanica po ml). Injekcije su aplicirane dva puta tjedno u uzastopnim dozama od 0,2; 0,4; 0,8 i 1,0 ml. Tjedan dana nakon posljednje aplikacije, kunićima je puštena krv iz ušne vene. Dva tjedana kasnije, ovaj postupak imunizacije je ponovljen s dozama od 1,0 ml. Poliklonski antiserumi su pohranjeni na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do korištenja (Sørensen i sur., 1986; Fouz i Amaro, 2003). Sva ispitivanja koja uključuju pokuse na životinjama odobrena su od strane Odbora za institucionalnu njegu i korištenje životinja i lokalne vlasti (Conselleriade Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural. Generalitat Valenciana, Valencija, Španjolska), u skladu s europskom Direktivom 2010/63/EU i španjolskim zakonom “Real Decreto 53/2013.” Imunizacija kunića provedena je po licenci projekta 2020/VSC/PEA/0054 u sklopu Odjela za istraživanje Sveučilišta u Valenciji.

3.6.1.3. O antigen za testove aglutinacije

Odabrani bakterijski izolati su bili umnoženi na pločama s krvnim agarom (10^8 CFU/ml) tijekom 18 – 20 h na $25\text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega su prebačene u 3 ml otopine puferiranog natrij acetata, formaldehida i fiziološke otopine (0,05 M NaCOOCH_3 , 0,1 M NaCl, 1% (vol/vol) formaldehid (40%), pH 7,5). Antigen korišten za test aglutinacije je pripremljen zagrijavanjem bakterijske suspenzije na $100\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 1 sata kako bi se uništio flagelarni antigen (Sørensen i sur., 1986).

3.6.1.4. Testovi aglutinacije na predmetnom stakalcu

Test je izvršen na predmetnom stakalcu kružnim miješanjem bakteriološkom uškom ispunjenom suspenzijom O antigena s dodatkom nerazrijeđenog poliklonskog antiseruma kunića. Korišteni su kunićji antiserumi za utvrđivanje tri serogrupe: A, B i C (Fouz i sur., 2017; Amaro i sur., 2020). Aglutinacija je praćena pregledavanjem na tamnoj pozadini. Izrazita aglutinacija koja se odmah javlja (<30 sekundi) je registrirana kao pozitivna, a negativna je izostanak ili samo slaba aglutinacija koja se dogodi nakon 30 sekundi. Kontrolnim skupinama je aplicirana sterilna 0,9% (vol/vol) fiziološka otopina pomješana sa serumom neimuniziranih kunića (Sørensen i sur., 1986; Fouz i Amaro, 2003).

3.7. Određivanje antimikrobnih svojstava

Svi izolati su testirani metodama disk difuzije i mikrodilucije (određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracije) na jedanaest antimikrobnih tvari koje spadaju u devet različitih skupina: penicilini (ampicilin), cefalosporini (ceftazidim), fluorokinoloni (enrofloksacin i florfenikol), aminoglikozidi (gentamicin), kloramfenikol, karbapenemi (meropenem), tetraciklini (oksitetraciklin), kinoloni (oksolinična kiselina), sulfonamidi (sulfametoksazol i trimetoprim/sulfametoksazol).

3.7.1. Test disk difuzije

Za izvođenje testa disk difuzije (Bauer i Kirby, 1966) korištene su prekončne bakterijske kolonije (5×10^5 CFU/ml) uzgojene inkubacijom na 23 ± 2 °C na MA agaru (Condalab, Španjolska). U 5 ml kation-prilagođenom Muller-Hinton bujonu (Becton, Dickinson and Company, SAD) pripremljena je suspenzija bakterijskih stanica optičke gustoće koja odgovara standardu 0,5 McFarlanda ($1 \text{ McF} \sim 10^8$ CFU/ml) izmjerena pomoću denzitometra DEN-1 (Kisker Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka). Sterilni bris je umočen u bakterijsku suspenziju i pritiskanjem na unutarnju stijenku gornjeg dijela epruvete sa suspenzijom istisnut je višak tekućine. Mueller Hinton agar (Difco, SAD) je naciepljen brisom tri puta okrećući podlogu za 60° između svakog naciepljivanja da bi se obuhvatila cijela njegova površina. Naciepljena podloga je ostala pritvorena oko 5 minuta kako bi se osušila vlaga s površine agara prije stavljanja diskova impregniranih antimikrobnim tvarima. Pritvorena podloga je sušena uz upaljeni plamenik da se izbjegne kontaminacija. Potom su pomoću već ranije pripremljenog dispensora stavljeni diskovi na površinu agara. Korišteno je najviše 5 diskova na površinu petrijeve zdjelice promjera 100 mm. Korišteni su diskovi impregnirani različitim antimikrobnim tvarima u različitim koncentracijama: ampicilin 10 µg (Becton, Dickinson and Company, SAD), ceftazidim 10 µg (Mast Group, Njemačka), enrofloksacin 5 µg (Becton, Dickinson and Company, SAD), florfenikol 30 µg (Oxoid, Velika Britanija), gentamicin 10 µg (Becton, Dickinson and Company, SAD), kloramfenikol 30 µg (Becton, Dickinson and Company, SAD), meropenem 10 µg (Becton, Dickinson and Company, SAD), oksitetraciklin 30 µg (Becton, Dickinson and Company, SAD), oksolinična kiselina 2 µg (Biolab, Mađarska), sulfametoksazol 300 µg (Biolab, Mađarska) i trimetoprim/sulfametoksazol 1,25/23,75 µg (Becton, Dickinson and Company, SAD). Tako pripremljene ploče s poklopcima okrenutim prema gore stavljene su u termostat na

28 °C tijekom 24-28 h. Nakon inkubacije očitani su rezultati mjerenjem promjera zone inhibicije izraženog u milimetrima. Test je izveden te su rezultati očitani i interpretirani prema smjernicama CLSI-a (engl. Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2021., Smith i Egan, 2018., Smith, 2019). Kao kontrolni sojevi korištene su referentne bakterije *Escherichia coli* ATCC 25922 (engl. *American Type Culture Collection*, ATCC) i *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 s poznatim prihvatljivim rasponima osjetljivosti za korištene antimikrobne tvari.

3.7.2. Test mikrodilucije

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) određivane su metodom mikrodilucije u bujonu. Ovom metodom određene su minimalne koncentracije antibiotika koji inhibiraju rast bakterije *V. harveyi*. Prekonoćne bakterijske kolonije (5×10^5 CFU/ml) uzgojene inkubacijom na 23 ± 2 °C na Marine agaru (Condalab, Španjolska) prebačene su u 5 ml kation-prilagođenog Muller-Hinton bujona (Becton, Dickinson and Company, SAD). Pripremljena suspenzija bakterijskih stanica bila je optičke gustoće koja odgovara standardu 0,5 McFarlanda (1 McF $\sim 10^8$ CFU/ml) izmjerena pomoću denzitometra DEN-1 (Kisker Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka). Radna otopina ispitivanog izolata je vorteksirana 10 sekundi, zatim je 10 μ l prebačeno u 11 ml kation-prilagođenog Muller-Hinton bujona (Becton, Dickinson and Company, SAD) i suspenzija je vorteksirana slijedećih 10 sekundi. Potom je 100 μ l suspenzije odmjereno u svaku jažicu mikrotitracijske ploče s razrijeđenjima antimikrobnih tvari te su ploče prekrivene ljepljivom trakom da tijekom inkubacije od 24 – 28 h na 28 °C bujon ne bi ishlapio. Korištene su 96 jažične ECOFFVIB mikrotitracijske ploče kreirane prema Baron i sur. (2020) (Thermo Fisher Scientific, SAD). Mikrotitracijske ploče su sadržavale antimikrobne tvari koje se često koriste za liječenje u akvakulturi, one važne za liječenje ljudi oboljelih od bakterija roda *Vibrio* te antimikrobne tvari čija je upotreba zabranjena (npr. kloramfenikol). Ploče su sadržavale antimikrobne tvari u koncentracijama kako slijedi: ampicilin (AMP) 0,03 – 16 μ g/ml, ceftazidim (TAZ) 0,03 – 16 μ g/Ll, kloramfenikol (CHL) 0,5 – 64 μ g/ml, enrofloksacin (ENRO) 0,002 – 0,5 μ g/ml, florfenikol (FFN) 0,06 – 16 μ g/ml, gentamicin (GEN) 0,06 – 8 μ g/mL, meropenem (MERO) 0,008 – 1 μ g/ml, oksolonična kiselina (OXO) 0,008 – 1 μ g/ml, oksitetraciklin (OXY) 0,015 – 2 μ g/ml, sulfametoksazol (SMX) 4 – 512 μ g/ml i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) 0,015/0,30 – 2/38 μ g/ml (Slika 4.). Kao kontrolni sojevi korištene su referentne bakterije *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 prema preporukama CLSI (2020a). CLSI

dokument VET04 (CLSI, 2020b) je dao prihvatljive raspone osjetljivosti za referentne sojeve kao kontrolu kvalitete.

Rezultati su očitani korištenjem postolja s konkavnim ogledalom pomoću kojeg se vidjelo dno jažice. U pojedinoj jažici je došlo do bakterijskog rasta ako je bujon zamućen ili su bile vidljive bakterijske stanice na dnu jažice. Minimalna inhibicijska koncentracija je najmanja koncentracija antimikrobne tvari koja spriječava rast bakterije.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GEN 0.06	OXO 0.008	SMX 4	SXT 0.015/0.3	CHL 0.5	MERO 0.008	AMP 0.03	AMP 8	TAZ 2	ENRO 0.03	FFN 0.5	OXY 0.06
B	GEN 0.12	OXO 0.015	SMX 8	SXT 0.03/0.6	CHL 1	MERO 0.015	AMP 0.06	AMP 16	TAZ 4	ENRO 0.06	FFN 1	OXY 0.12
C	GEN 0.25	OXO 0.03	SMX 16	SXT 0.06/1.19	CHL 2	MERO 0.03	AMP 0.12	TAZ 0.03	TAZ 8	ENRO 0.12	FFN 2	OXY 0.25
D	GEN 0.5	OXO 0.06	SMX 32	SXT 0.12/2.38	CHL 4	MERO 0.06	AMP 0.25	TAZ 0.06	TAZ 16	ENRO 0.25	FFN 4	OXY 0.5
E	GEN 1	OXO 0.12	SMX 64	SXT 0.25/4.75	CHL 8	MERO 0.12	AMP 0.5	TAZ 0.12	ENRO 0.002	ENRO 0.5	FFN 8	OXY 1
F	GEN 2	OXO 0.25	SMX 128	SXT 0.5/9.5	CHL 16	MERO 0.25	AMP 1	TAZ 0.25	ENRO 0.004	FFN 0.06	FFN 16	OXY 2
G	GEN 4	OXO 0.5	SMX 256	SXT 1/19	CHL 32	MERO 0.5	AMP 2	TAZ 0.5	ENRO 0.008	FFN 0.12	OXY 0.015	OXY 4
H	GEN 8	OXO 1	SMX 512	SXT 2/38	CHL 64	MERO 1	AMP 4	TAZ 1	ENRO 0.015	FFN 0.25	OXY 0.03	POS

Slika 4. Prikaz rasporeda antimikrobnih tvari i njihova koncentracija u jažicama ECOFFVIB mikrotitracijskih ploča za određivanje MIC-ova.

*GEN – gentamicin, OXO – oksolonična kiselina, SMX – sulfametoksazol, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, CHL – kloramfenikol, MERO – meropenem, AMP – ampicilin, TAZ – ceftazidim, ENRO – enrofloksacin, FFN – florfenikol, OXY – oksitetraciklin.

3.8. Sekvenciranje genoma

Cjelogenomsko sekvenciranje šesnaest odabranih izolata bakterije *V. harveyi* provedeno je primjenom ONT MinION (Oxford Nanopore Technologies, Velika Britanija) tehnologijom, a od ukupnih šesnaest, jedanaest ih je sekvencirano i primjenom Illumina HiSeq tehnologije koristeći usluge MicrobesNG, Velika Britanija.

3.8.1. Izdvajanje DNA iz bakterijskih kolonija za sekvenciranje cijelog genoma

Za izolaciju visokomolarne genomske DNA korišten je komplet QIAGEN Blood & Cell Culture DNA (Qiagen, Njemačka) koji sadrži set pufera Qiagen Genomic DNA Buffer Set i kolone Qiagen Genomic-tip 500/G.

Čiste bakterijske kolonije su suspendirane u tubici s 11 ml pufera B1 (u koji je prethodno dodano 22 µl Rnase A) uz snažno vorteksiranje da se dobije homogena suspenzija. Suspenziji je dodano 300 µl Lysozyme stock solution i 500 µl QIAGEN Proteinase K te je inkubirana na 37 °C tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije dodano je 4 ml pufera B2 te je suspenzija vorteksirana nekoliko sekundi. Kolona (QIAGEN Genomic – tip 500/G) je isprana s 10 ml pufera QBT. Potom je bakterijska suspenzija prenesena u tubice s kolonama (QIAGEN Genomic – tip 500/G). Kolone su dva puta isprane dodavanjem 15 ml pufera QC. Kolona je prebačena u novu sabirnu tubicu te je genomska DNA ekstrahirana dodavanjem 15 ml pufera QF. DNA je izdvojena nakon laganog miješanja tubice pomoću staklenog štapića te je prebačena u novu tubicu u kojoj se nalazilo 2 ml Tris HCl (10 mM, pH 8,5). U završnom koraku tubica s DNA je postavljena na grijaći blok (TS-100 Thermo-Shaker, Biosan, Latvija) na 55 °C tijekom 2 sata.

3.8.2. Kapilarna elektroforeza

Kontrola kvalitete genomske DNA određena je korištenjem kapilarne elektroforeze QIAxcel-om (Qiagen, Njemačka) korištenjem DNA High Resolution kompleta (Qiagen, Njemačka) te biljega veličine (50 bp – 800 bp; QX DNA Size Marker, Qiagen) i biljega poravnanja (15 pb – 3 kb; QX Alignment Marker, Qiagen). Uzorci su razrijeđeni 1:2 dodavanjem 5 µl uzorka na 5 µl pufera EBA (Qiagen, Njemačka). Korišten je profil GeneRead LP_ATP_BRCA_v2 na uređaju QIAxcel.

3.8.3. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA u izolatu izmjerena je pomoću uređaja Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, SAD). Izdvojena DNA korištena je za pripremu knjižnice za sekvenciranje tehnologijom na uređaju ONT MinION i Illumina HiSeq.

3.8.4. Priprema knjižnice za sekvenciranje tehnologijom nanopora na uređaju ONT MinION

Prije pripreme knjižnice u računalnom softveru MinKNOW(GUI) (Oxford Nanopore Technologies, ONT, Velika Britanija) je kontrolom kvalitete utvrđen broj aktivnih pora na protočnoj stanici (Flow Cell, Oxford Nanopore Technologies, Velika Britanija). Sekvenciranje je provedeno u dva navrata, u prvom s tri izolata po protočnoj stanici, a u drugom s trinaest izolata po protočnoj stanici.

Knjižnica je pripremljena koristeći komplete: Rapid Sequencing Kit, Rapid Barcoding Kit, Flow Cell Wash Kit, Flow Cell Priming Kit (Oxford Nanopore Technologies, ONT, Velika Britanija).

U tubicu volumena 0,2 ml dodano je 9 μ l DNA (\sim 1 μ g) pojedinog izolata i 3 μ l barkoda (Fragmentation Mix RB01), te po jedan barkod je korišten za svaki izolat. Suspenzije su pažljivo promiješane te inkubirane na 30 °C, 1 minutu, zatim na 80 °C tijekom 1 minute koristeći grijaći blok (TS-100 Thermo-Shaker, Biosan, Latvija). Nakon toga uzorci su stavljeni na led da se ohlade. Svi uzorci označeni barkodovima su pomiješani u jedan te je zabilježen ukupni volumen. Uzorak je pročišćen pomoću reagensa Solid Phase Reversible Immobilization beads (SPRI beads), paramagnetskih kuglica koje selektivno vežu DNA. Na ukupni volumen suspenzije uzoraka dodana je polovica od tog volumena reagensa SPRI beads. Suspenzija je inkubirana laganim miješanjem na grijaćem bloku tijekom 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije suspenzija uzoraka je postavljena na magnetski stalak (DynaMagTM-2, Invitrogen, SAD). Suspenzija uzoraka se na magnetskom stalku razbistrila i dobio se pelet od magnetskih kuglica. Dok je suspenzija bila na magnetskom stalku odpipetiran je supernatant, a magnetske kuglice su isprane s 200 μ l 80%-e otopine etanola (Merck & Co., SAD). Suspenzija je inkubirana 30 sekundi te je nakon toga odpipetiran etanol. Postupak je ponovljen još jednom, nakon čega je etanol odpipetiran i tubica je ostavljena da se osuši na zraku tijekom 1 minute. Tubica je uklonjena s magnetskog stalka, a pelet je otopljen s 12 μ l pufera EB. Suspenzija je inkubirana tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi te je ponovno postavljena na magnetski stalak sve dok nije postala potpuno bistra. Nakon toga je odpipetirano 12 μ l supernatanta u novu tubicu, a magnetske kuglice su bačene.

Dodan je 1 μ l reagensa Rapid sequencing adapter (RAP) u 10 μ l suspenzije DNA označene barkodovima. RAP sadrži adaptore potrebne za sekvenciranje kako bi se fragmenti DNA mogli navoditi kroz nanopore. Smjesa je zatim inkubirana tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi.

Smjesa koja će biti korištena kao DNA knjižnica je pohranjena na led do inokulacije na protočnu stanicu uređaja MinION.

3.8.5. Sekvenciranje tehnologijom nanopora na uređaju ONT MinION

Dodano je 30 µl reagensa Flush Tether (FLT) u Flush Buffer (FLB) tubicu i promiješano te se smjesa koristila za ispiranje. Nakon što je odstranjen poklopac na MinION uređaju odstranjen je zrak iz protočne stanice uređaja pomoću pipete. Dodano je 800 µl smjese za ispiranje u protočnu stanicu izbjegavajući stvaranje mjehurića zraka.

Pripremljena je smjesa za sekvenciranje koja je sadržavala slijedeće reagense: 34 µl Sequencing Buffer (SQB), 25,5 µl Ligation Buffer (LB), 4,5 µl ultra-čiste vode i 11 µl smjese DNA knjižnice te je smjesa dodana u otvor za uzorak, nakon čega su svi otvori na uređaju zatvoreni i postavljen je poklopac.

Pokrenuta je reakcija sekvenciranja na računaru u softveru MinKNOW(GUI). Električni signali koje stvara lanac DNA prolaskom kroz nanopore pretvara se u bazni slijed (engl. *basecalling*). Guppy, alat koji je integriran u MinKNOW, iz sirovih podataka signala stvara dodatnu FAST5 datoteku modificiranih baznih vjerojatnosti te ju prebacuje u FASTQ format.

3.8.6. Priprema DNA izolata za sekvenciranje pomoću Illumina HiSeq sustava

Jedanaest izolata DNA poslano je u kompaniju MicrobesNG (Birmingham, Velika Britanija) na sekvenciranje pomoću Illumina HiSeq sustava.

Na sekvenciranje je poslano 100 µl DNA svakog izolata, koncentracije od 2 ng/µl, ~40 000 bp, razrijeđenih u Tris – HCl (10 Mm, pH 8,5) (Invitrogen, SAD). Uzorci su poslani u tubicama volumena 2 ml s pripadajućim barkodovima koji su dobiveni nakon registracije u sustavu kompanije MicrobesNG.

3.8.7. Bioinformatička analiza slijedova dobivenih tehnologijom nanopora i Illumina HiSeq sustavom

Za slaganje genoma pojedinih izolata korištena je knjižnica dobivena sekvenciranjem ONT MinION tehnologijom. Za vizualizaciju kvalitete dobivenih očitavanja korišten je alat FastQC. Da bi se uklonili adapteri i filtrirala očitavanja korišten je alat Cutadapt (Martin, 2011). Za sastavljanje genoma od dobivenih očitavanja korišteni su alati Raven (Vaser i Šikić, 2021) i Flye (Kolmogorov

i sur., 2020). Pomoću alata Bandage (Wick i sur., 2015) koji generira grafove iz složenih genoma vizualizirana je prisutnost kromosoma i plazmida te je uspoređena uspješnost sastavljanja genoma primjenom alata Raven i Flye. Nakon toga je izvršeno sjedinjavanje (engl. *polishing*) da bi se postigla što veća točnost rezultata. Složeni genomi iz očitavanja dobivenih ONT MinION tehnologijom polirani su očitanjima dobivenim sekvenciranjem Illumina HiSeq sustavom korištenjem alata Hypo (Kundu i sur., 2019). Izolati koji nisu sekvencirani Illumina HiSeq sustavom su polirani očitanjima dobivenim ONT MinION tehnologijom korištenjem alata Medaka. Nakon poliranja korišten je alat BUSCO (engl. *Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*) (Simão i sur., 2015) koji služi za pretraživanje učinkovitosti slaganja genoma. Za pretraživanje je odabran set za bakterije (engl. *BUSCO bacterial gene set OGS analysis*), red *Vibrionales*. Alat Quast (Gurevich i sur., 2013) je korišten za procjenu kvalitete i za uspoređivanje sastavljenih genoma.

Detekcija gena virulencije provedena je korištenjem baze podataka VFBD (engl. *Virulence Factor Database*) (Chen i sur., 2005) u koju su učitane sekvence genoma bakterijskih izolata u FASTA formatu. Analiza gena antimikrobne rezistencije provedena je u bazi podataka CARD 3.1.4 (engl. *Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD*) (Alcock i sur., 2020) koristeći identifikator RGI 5.2.0 (engl. *Resistance Gene Identifier, RGI*) tako što su u bazu podataka učitane sekvence genoma pretraživanih izolata u FASTA formatu.

3.9. Izrada filogenetskog stabla

Filogenetska stabla su rekonstruirana za 16 izolata koji su sekvencirani ONT MinION tehnologijom. Nakon što je sastavljen genom, pretražen je pomoću informatičkih naredbi u operacijskom sustavu Ubuntu 20.04 te su izdvojene sekvence *toxR* gena. Filogenetska stabla su rekonstruirana na temelju sekvenciranog gena *toxR*. Osim sekvenci dobivenih u ovom istraživanju u filogenetsku analizu uključene su i dostupne sekvence *toxR* gena preuzete iz banke gena (GenBank, NCBI) koje su prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz pristupnih brojeva sekvenci preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI) koje su uz sekvence izolata korištene u ovom istraživanju uključene u konstrukciju filogenetskog stabla.

GenBank pristupni broj	Porijeklo izolata
FR719020.1	Španjolska
FR719019.1	Španjolska
FR719018.1	Španjolska
FR719015.1	Španjolska
FR719010.1	Španjolska
FR719009.1	Španjolska
FR719017.1	Španjolska
JF930597.1	SAD
JF930594.1	SAD
JF930621.1	SAD
JF930617.1	SAD
EF645830.1	Kina
DQ445049	Filipini

Za višestruko sravnjivanje sekvenci korišten je program MUSCLE uključen u program MEGAX (Kumar i sur., 2018). Pri višestrukome sravnjivanju sekvenci korištene su standardne postavke programa MUSCLE. Za filogenetsku analizu primjenom metode povezivanja susjeda (engl. *Neighbour-Joining*) i najveće vjerojatnosti (engl. *Maximum Likelihood*) korišten je program MEGAX (Kumar i sur.; 2018). Pri rekonstrukciji filogenetskog stabla primjenom metode

povezivanja susjeda korišten je model p-distance, a analiza je obuhvatila parcijalne delecije (engl. *partial deletion*). Za statističku analizu vjerodostojnosti grupiranja korištena je metoda samoučitavanja (engl. *Bootstrap*) u 1000 ponavljanja. Najprikladniji model za rekonstrukciju filogenetskog stabla primjenom metode najveće vjerojatnosti određen je u programu MEGAX na osnovu ML heurističke metode (engl. *Maximum Likelihood, ML*). Ova metoda maksimizira vjerojatnost grupiranja određenih skupina sekvenci u te iste skupine. Korišten je model Kimura 2-parameter, a analiza je obuhvatila sve delecije (engl. *complete deletion*). Za statističku analizu vjerodostojnosti grupiranja korištena je metoda samoučitavanja (engl. *Bootstrap*) u 1000 ponavljanja.

3.10. Statistička obrada podataka

U ovom istraživanju su korištene metode deskriptivne statistike (grupiranje, tablično prikazivanje, grafičko prikazivanje, izračunavanje mjera centralne tendencije, mjera disperzije te tablice kontigencije). Rezultati su obrađeni u JASP 0.16 programu za statističku obradu podataka te Microsoft Office Excel 2010 programu.

4. REZULTATI

4.1. Identifikacija bakterijskih izolata na temelju morfoloških i biokemijskih svojstava

Svih 39 istraživanih bakterijskih izolata su Gram-negativni, blago zakrivljeni, pokretljivi štapići koji imaju svojstvo tvorbe oksidaze i katalaze te imaju fermentacijski metabolizam glukoze. Svi izolati na krvnom agaru pokazuju α – hemolizu, osim dva izolata kod kojih hemoliza nije bila prisutna (γ – hemoliza) (Tablica 5.). Nijedan izolat nije rastao na temperaturi od 4 °C, a pet izolata nije raslo na temperaturi od 15 °C. Svi su pokazivali svojstvo rasta na 23 °C, a sedam izolata je raslo na temperaturi od 37 °C. Svi izolati su rasli u peptonskoj vodi s dodatkom 0,5 do 6% soli, dok nijedan izolat *V. harveyi* nije rastao u peptonskoj vodi s 10% soli (Tablica 5.). Izmjerena je optička gustoća suspenzija bakterijskih izolata u peptonskoj vodi s različitim koncentracijama soli. Utvrđeno je da prosječna optička gustoća suspenzije bakterija u peptonskoj vodi s dodatkom 0,5% soli iznosi 10,9 McF, u suspenziji s dodatkom 3% soli je 8,9 McF te se smanjuje povišenjem koncentracije soli. U suspenziji s dodatkom soli od 6% iznosi 6,0 McF. Suspenzija s dodatkom 10% soli nakon inkubacije ima jednaku optičku vrijednost kao i prije inkubacije, odnosno 0,7 McF.

Tablica 5. Prikaz biokemijskih svojstava izolata bakterije *V. harveyi*.

Izolot	Tip hemolize		Pokretljivost	Oksidacijsko-fermentacijska svojstva	Tvorba oksidaze	Tvorba katalaze	Sposobnost rasta na različitim temperaturama				Sposobnost rasta u različitim koncentracijama soli (NaCl)			
	α	γ					4°	15°	23°	37°	0,5 %	3%	6%	10%
							C	C	C	C				
FR-1	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
FR-2	+		+	F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
FR-3	+		+	F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
FR-4	+		+	F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
FR-5	+		+	F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
FR-6	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
FR-7	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
FR-8	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
FR-9	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
FR-10	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
ESP	+		+	F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
TR-2	+		+	F	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
IT-1	+		+	F	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
IT-2	+		+	F	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
IT-3	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
IT-4	+		+	F	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
IT-5	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
IT-6	+		+	F	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
IT-7	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
IT-8	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
94/17	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
101/17	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
126/17	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
127/18	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
164/18	+		+	F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
166/18	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

Tablica 5. nastavak

112/19	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
115/19		+	+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
120/19	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
160/19	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
133/20	+		+	F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
225/20		+	+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
121/21	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
327/21	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
335/21	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
A2	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
A27	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
A32	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
A39	+		+	F	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

Testnim kompletom API 20E utvrđeno je da izolati ne posjeduju β – galaktozidazu, arginin dihidrolaza i ureazu te, ne oslobađaju sumporvodik i ne fermentiraju šećere inozitol, ramnozu, melibiozu i arabinozu. Pri fermentaciji glukoze ne tvore acetoin u Voges Proskauer reakciji. Svi izolati imaju sposobnost produkcije nitrata te fermentiraju šećere glukozu, manitol, saharozu i amigdalín. Utvrđena su tri izolata koja ne posjeduju lizin dekarboksilazu, osam izolata ne posjeduje triptofan deaminazu, sedam izolata nije sposobno razgraditi aminokiselinu triptofan u indol. Od svih ispitanih izolata njih šest ne može iskoristiti citrat. Utvrđeno je petnaest izolata koji posjeduju ornitin dekarboksilazu i devetnaest izolata koji posjeduju želatinazu. Ukupno je devet izolata koji ne fermentiraju sorbitol (Tablica 6.).

Tablica 6. Prikaz biokemijskih svojstava izolata bakterije *V. harveyi* određenih API 20E kompletom.

Izolati	Biokemijski test	O	A	L	O	C	H ₂ S	U	T	I	VP	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A	NO ₂
		N	D	D	D	I	R	D	N	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R	NO ₂		
		P	H	C	C	T		E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A	
FR-1		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-2		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-3		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-4		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-5		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-6		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-7		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-8		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-9		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FR-10		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
ESP		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
TR-2		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
IT-1		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
IT-2		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
IT-3		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
IT-4		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
IT-5		-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
IT-6		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
IT-7		-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Tablica 6. nastavak

IT-8	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
94/17	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
101/17	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
126/17	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
127/18	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
164/18	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
166/18	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
112/19	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
115/19	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
120/19	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
160/19	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
133/20	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
225/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
121/21	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
327/21	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
335/21	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
A2 (72/16)	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
A27 (150/16)	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
A32	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
A39	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+

* ONPG = beta – galaktozidaza, ADH = arginin dihidrolaza, LDC = lizin dekarboksilaza, ODC = ornitin dekarboksilaza, CIT = citrat, H₂S = proizvodnja sumporvodika, URE = ureaza, TDA = triptofan deaminaza, IND = indol, VP = Voges-Proskauer, GEL = želatinaza, GLU = glukoza, MAN = manitol, INO = inozitol, SOR = sorbitol, RHA = ramnoza, SAC = saharoza, MEL = melibioza, AMY = amigdalina, ARA = arabinoza, OX = oksidaza, NO₂ = redukcija nitrata

4.2. Molekularna identifikacija izolata

Nukleotidni slijedovi gena *16S rRNA* dobiveni sekvenciranjem pročišćenih produkata lančane reakcije polimerazom svih izolata su analizirane i uspoređene s dostupnim nukleotidnim slijedovima pohranjenim u GenBank banci gena, koja je pretražena pomoću programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI). Analiza je pokazala da svi izolati pripadaju rodu *Vibrio* sa preko 99% sličnosti sekvenci sa sekvencama *V. harveyi* dostupnim u bazi.

Nakon provedene lančane reakcije polimerazom umnažanjem odsječka gena *toxR* utvrđena je pripadnost svih izolata vrsti *V. harveyi*. Produkti PCR reakcije su bili veličine 382 bp.

4.3. Serotipizacija

Serotipizirano je 29 odabranih izolata bakterije *V. harveyi* iz različitih područja Sredozemlja. U ovom istraživanju utvrđeno je da četiri izolata izdvojena u Francuskoj pripadaju serovaru A (FR-1, FR-6, FR-8 i FR-10), jedan serovaru C (FR-4), a dva ne pripadaju ni jednom dosada opisanom serovaru. Izolati iz Cipra (FR-2) i Tunisa (FR-5) ne pripadaju ni jednom opisanom serovaru. Od istraživanih izolata iz Italije, dva pripadaju serovaru C (IT-3 i IT-8), jedan serovaru A (IT-4), a četiri ne pripadaju ni jednom od navedenih serovarova. Španjolski izolat pripada serovaru B (ESP). Jedan turski izolat pripada serovaru A (TR-2), a drugi je serološki različit od opisanih serovarova. Od hrvatskih izolata četiri pripadaju serovaru A (94/17, 101/17, 166/18 i 120/19), dva izolata pripadaju serovaru B (127/18 i A27), jedan serovaru C (160/19), a dva su različita od opisanih serovarova (Tablica 7.).

Tablica 7. Prikaz bakterijskih izolata koji su serotipizirani te njihova pripadnost pojedinom serovaru.

Izolat	Test aglutinacije		
	Serovar A	Serovar B	Serovar C
FR-1	+	-	-
FR-2	-	-	-
FR-3	-	-	-
FR-4	-	-	+
FR-5	-	-	-
FR-6	+	-	-
FR-7	-	-	-
FR-8	+	-	-
FR-9	-	-	-
FR-10	+	-	-
ESP	-	+	-
TR-2	+	-	-
IT-1	-	-	-
IT-2	-	-	-
IT-3	-	-	+
IT-4	+	-	-
IT-5	-	-	-
IT-6	-	-	-
IT-7	-	-	-
IT-8	-	-	+
94/17	+	-	-
101/17	+	-	-
127/18	-	+	-
164/18	-	-	-
166/18	+	-	-
120/19	+	-	-
160/19	-	-	+
A2	-	-	-
A27	-	+	-

4.4. Antimikrobna svojstva

4.4.1. Rezultati disk difuzijskog testa

Test disk difuzije izveden je za svih 39 izolata obuhvaćenih ovim istraživanjem. Utvrđeno je da su svi izolati rezistentni na ampicilin. Jedan izolat iz Francuske (FR-3) i jedan iz Hrvatske (160/19) imali su manju zonu inhibicije od ostalih izolata za gentamicin. Vidljiva je rezistentnost na sulfametoksazol kod dva izolata iz Francuske (FR-9 i FR-9), jednog izolata iz Cipra (FR-2) i jednog izolata iz Turske (IT-5). Izolat iz Španjolske (ESP) je imao manju zonu inhibicije od ostalih izolata za sulfametoksazol. Dva izolata, turski (IT-5) i onaj iz Cipra (FR-2) imali su manje zone inhibicije za oksitetraciklin od ostalih izolata. S obzirom da ne postoje standardizirani kriteriji s određenim graničnim vrijednostima za tumačenje rezultata testa disk difuzije za bakteriju *V. harveyi* rezultati su prikazani samo kao veličina zone inhibicije izražene u milimetrima te se može vidjeti da su srednje vrijednosti zone inhibicije za sve korištene antibiotike, osim ampicilina veće od 20 mm (Tablica 8. i Slika 5.).

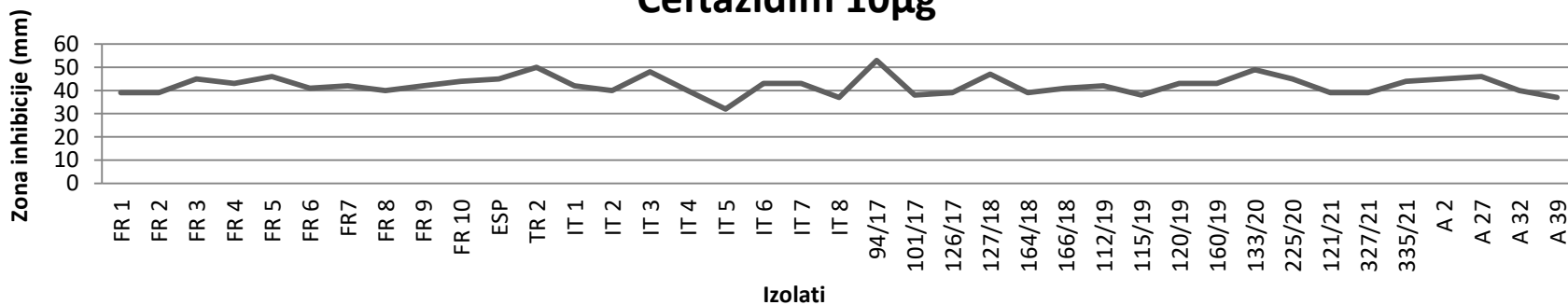
Tablica 8. Prikaz srednjih vrijednosti, minimalnih, maksimalnih vrijednosti zone inhibicije te standardne devijacije izolata korištenih u istraživanju osjetljivosti testom disk difuzije.

Antibiotik	Srednja vrijednost zone inhibicije (mm)	Minimalana vrijednost zone inhibicije (mm)	Maksimalna vrijednost zone inhibicije (mm)	Standardna devijacija
Ampicilin 10 μ g	0	0	0	0
Ceftafidim 10 μ g	42,3	32	53	4,06
Enrofloksacin 5 μ g	44,3	34	55	3,5
Florfenikol 30 μ g	43,9	19	53	6,35
Gentamicin 10 μ g	22,7	18	28	2,8
Kloramfenikol 30 μ g	43,1	20	54	6,91
Meropenem 10 μ g	46,3	40	53	5,05
Oksitetraciklin 30 μ g	34,1	11	41	5,9
Oksolonična kiselina 2 μ g	38,4	27	44	3,27
Sulfametoksazol 300 μ g	33,9	0	45	13,14
Trimetoprim/Sulfametoksazol 1,25/23,75 μ g	38	15	45	5,12

Ampicilin 10µg

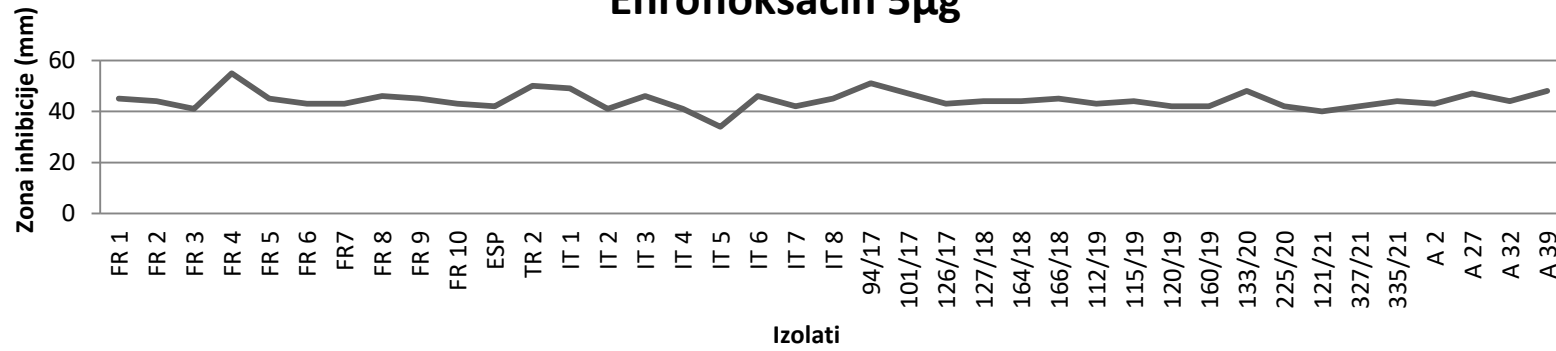


Ceftazidim 10µg

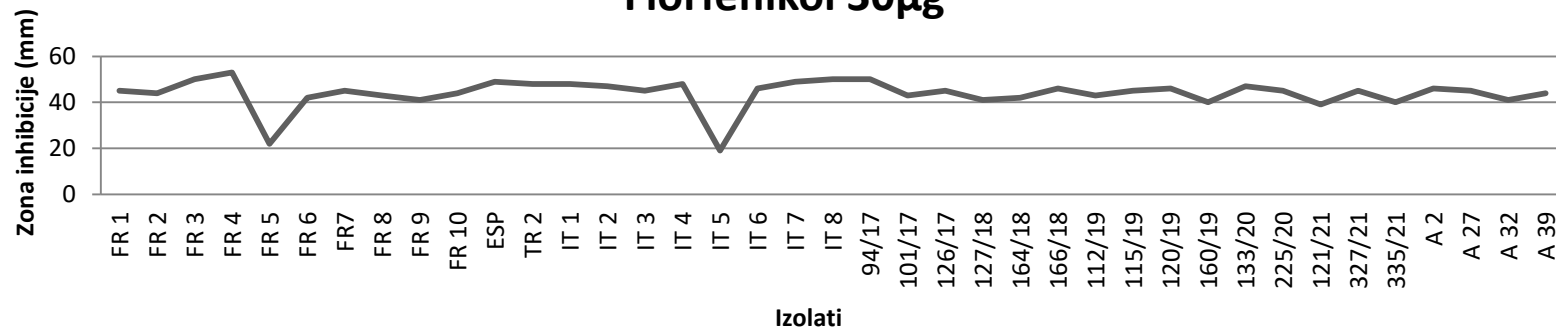


-opis slike se nalazi nakon posljednje slike u ovom nizu-

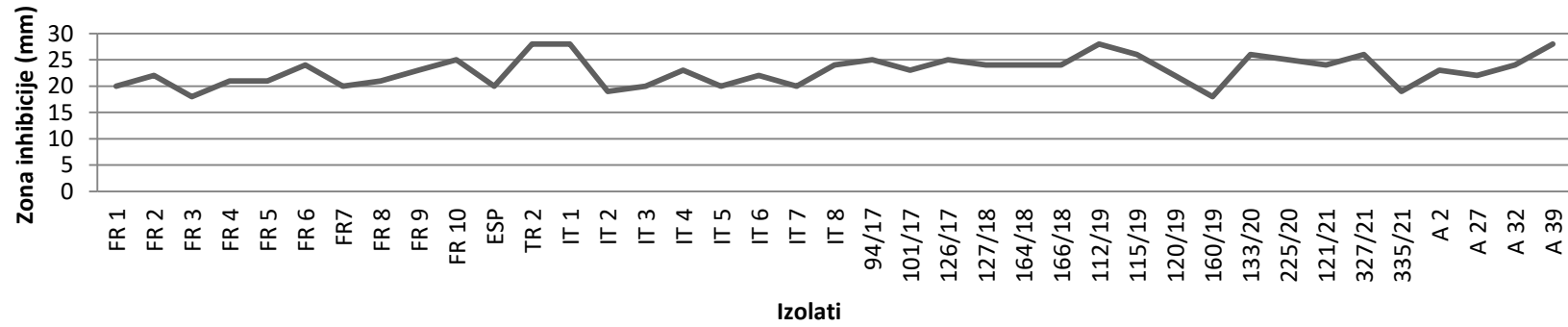
Enrofloksacin 5µg



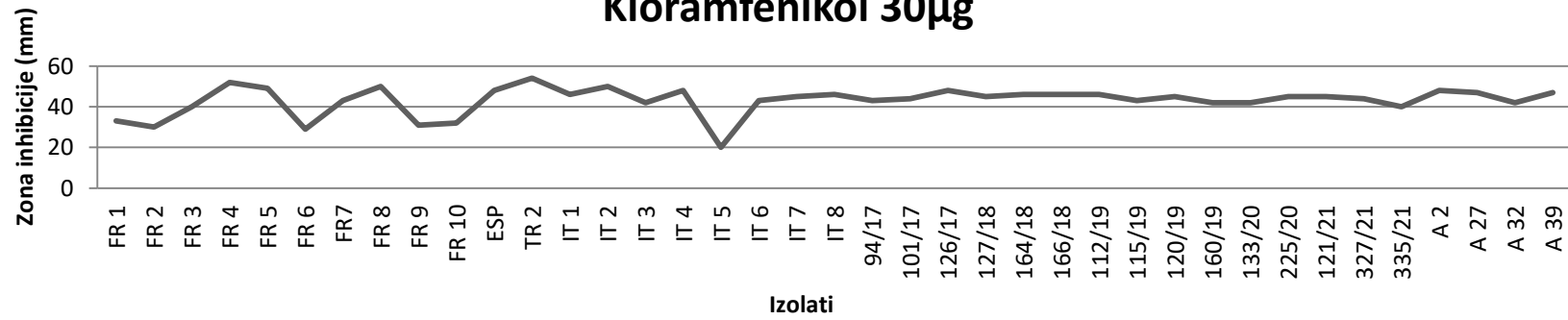
Florfenikol 30µg



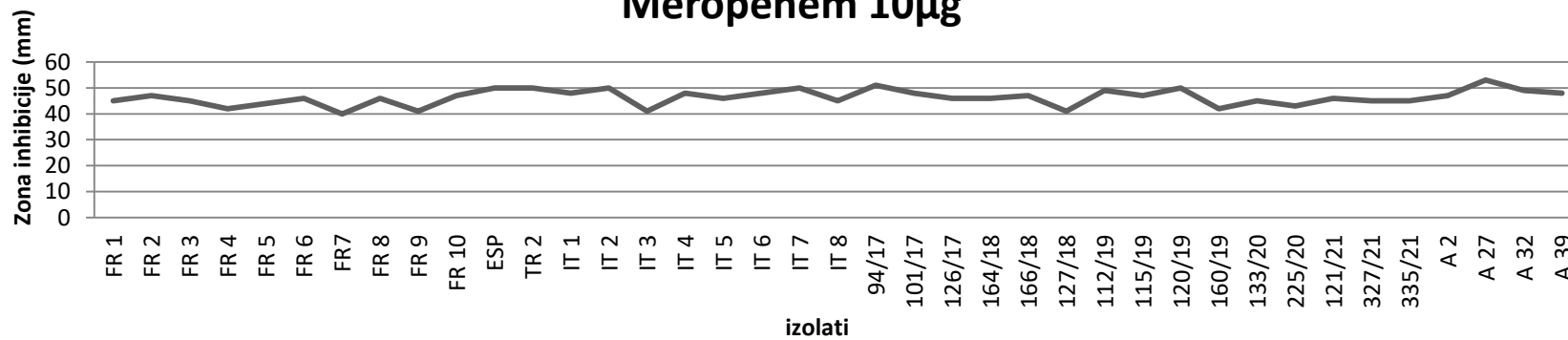
Gentamicin 10 µg



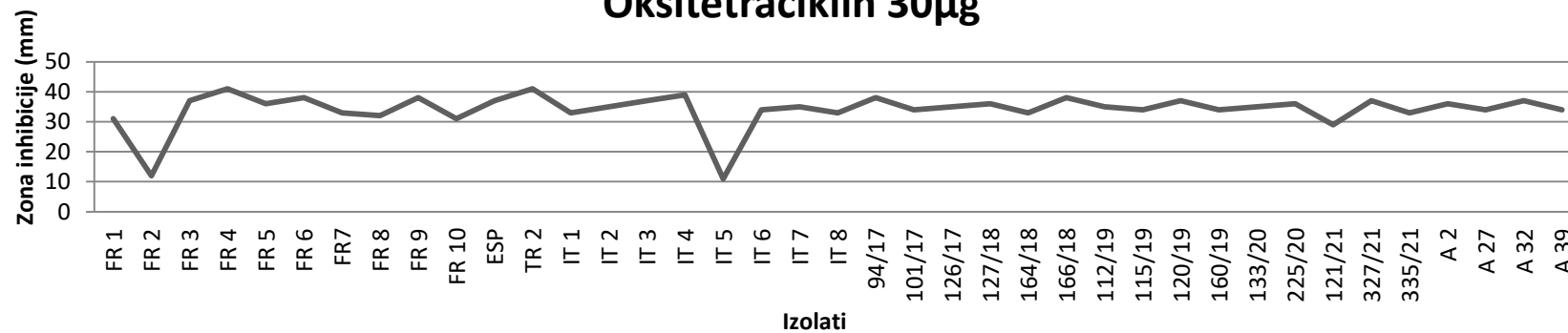
Kloramfenikol 30µg



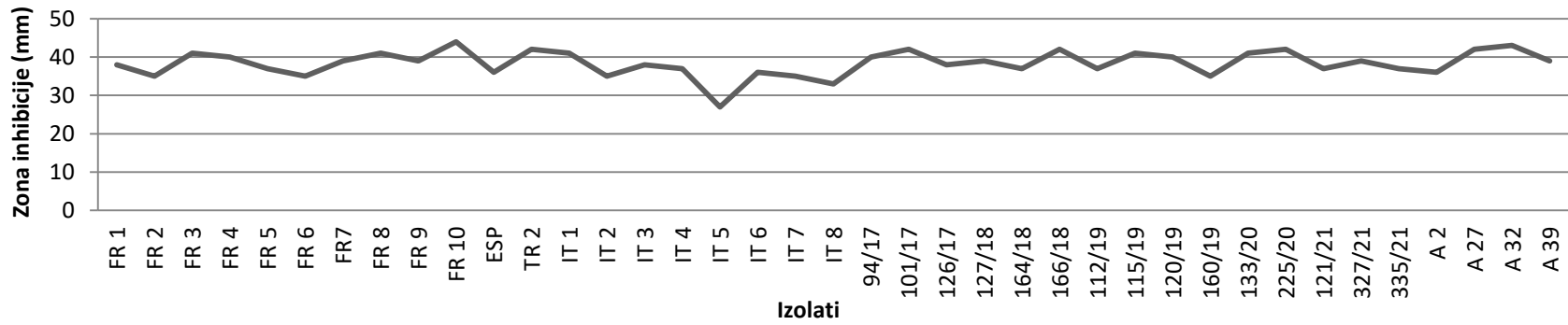
Meropenem 10µg



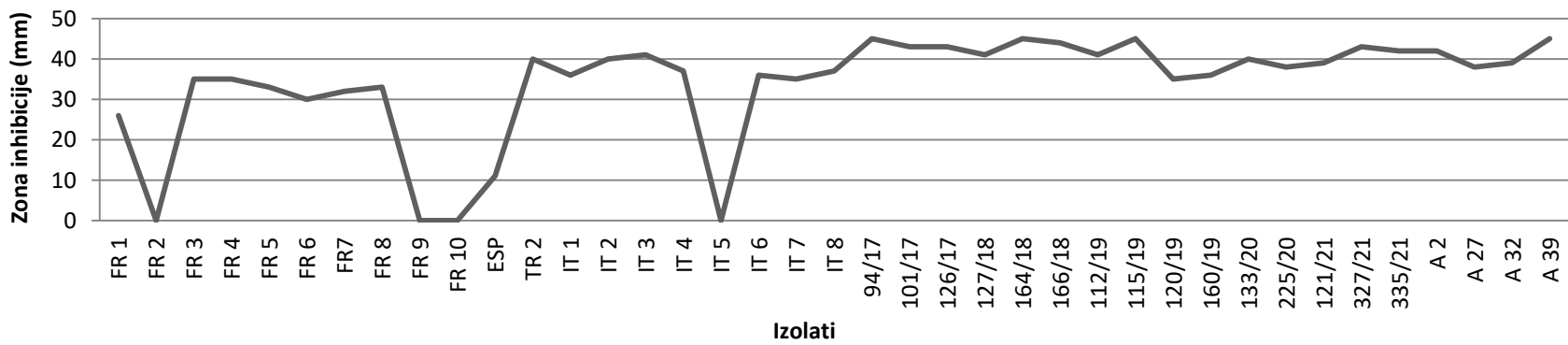
Oksitetraciklin 30µg

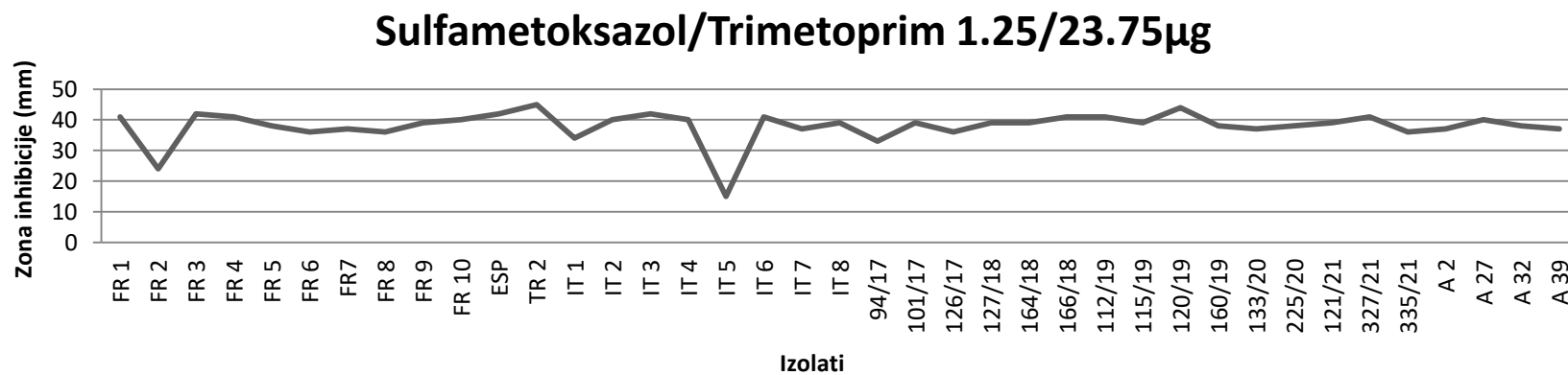


Oksolonična kiselina 2 μ g



Sulfametoksazol 300 μ g





Slika 5. Prikaz grafova s veličinama zona inhibicije (mm) izolata korištenih u istraživanju osjetljivosti testom disk difuzije.

4.4.2. Rezultati ispitivanja osjetljivosti testom mikrodilucije

Osjetljivost svih istraživanih izolata testirana je metodom mikrodilucije (određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije, MIC) na jedanaest antimikrobnih tvari koje spadaju u devet različitih skupina: penicilini (ampicilin), cefalosporini (ceftazidim), fluorokinoloni (enrofloksacin i florfenikol), aminoglikozidi (gentamicin), kloramfenikol, karbapenemi (meropenem), tetraciklini (oksitetraciklin), kinoloni (oksolinična kiselina) i sulfonamidi (sulfametoksazol i trimetoprim/sulfametoksazol).

MIC-ovi su određeni za svih 39 izolata bakterije *V. harveyi*. Raspon vrijednosti MIC-ova različitih antimikrobnih tvari za pretraživane izolate prikazan je u tablicama 9 i 10. Vidljivo je da su svi bakterijski izolati rezistentni na ampicilin. Jedan francuski izolat (FR-2) je inhibiran većom koncentracijom antibiotika u odnosu na druge izolate za gentamicin što je u skladu s rezultatima disk difuzije. Izolati iz Cipra (IT-5), Francuske (FR-9 i FR-10), Turske (FR-2) i Španjolske (ESP) su pokazali rezistentnost na sulfametoksazol, što je sukladno rezultatu disk difuzije. Izolati iz Turske (IT-5) i iz Cipra (FR-2) su pokazali rezistentnost na oksitetraciklin.

Tablica 9. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) (mg/L) antimikrobnih tvari za izolate bakterije *V. harveyi*. Siva polja prikazuju koncentracije antimikrobnih tvari koje nisu inhibirale rast svih bakterijskih izolata. Brojevi označavaju broj izolata koji je inhibiran navedenom koncentracijom antimikrobne tvari.

Antimikrobna tvar (mg/L)	Ukupan broj izolata	Koncentracija	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	512
Ampicilin 10 μ g	39																			
Ceftazidim 10 μ g	39									10	24	5								
Enrofloksacin 5 μ g	39							1	14	21	3									
Florfenikol 30 μ g	39									3	34			1		1				
Gentamicin 10 μ g	39											4	3	0	5					
Kloramfenikol 30 μ g	39									30		8						1		
Meropenem 10 μ g	39		23			15	2													
Oksitetraciklin 30 μ g	39								7	30				2						
Oksolinična kiselina 2 μ g	39								8	25	7	1								

Tablica 10. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) (mg/L) trimetoprim/sulfametoksazola za izolate bakterije *V. harveyi*. Siva polja prikazuju koncentraciju antimikrobne tvari koja nije inhibirala rast svih bakterijskih izolata. Brojevi označavaju broj izolata koji je inhibiran navedenom koncentracijom antimikrobne tvari.

Antimikrobna tvar (mg/L)	Ukupan broj izolata	Koncentracija							
		0,015/0,3	0,03/0,6	0,061/1,19	0,12/2,38	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38
Trimetoprim/ Sulfametoksazol 1,25/23,75 μ g	39			9	4	24	1	1	

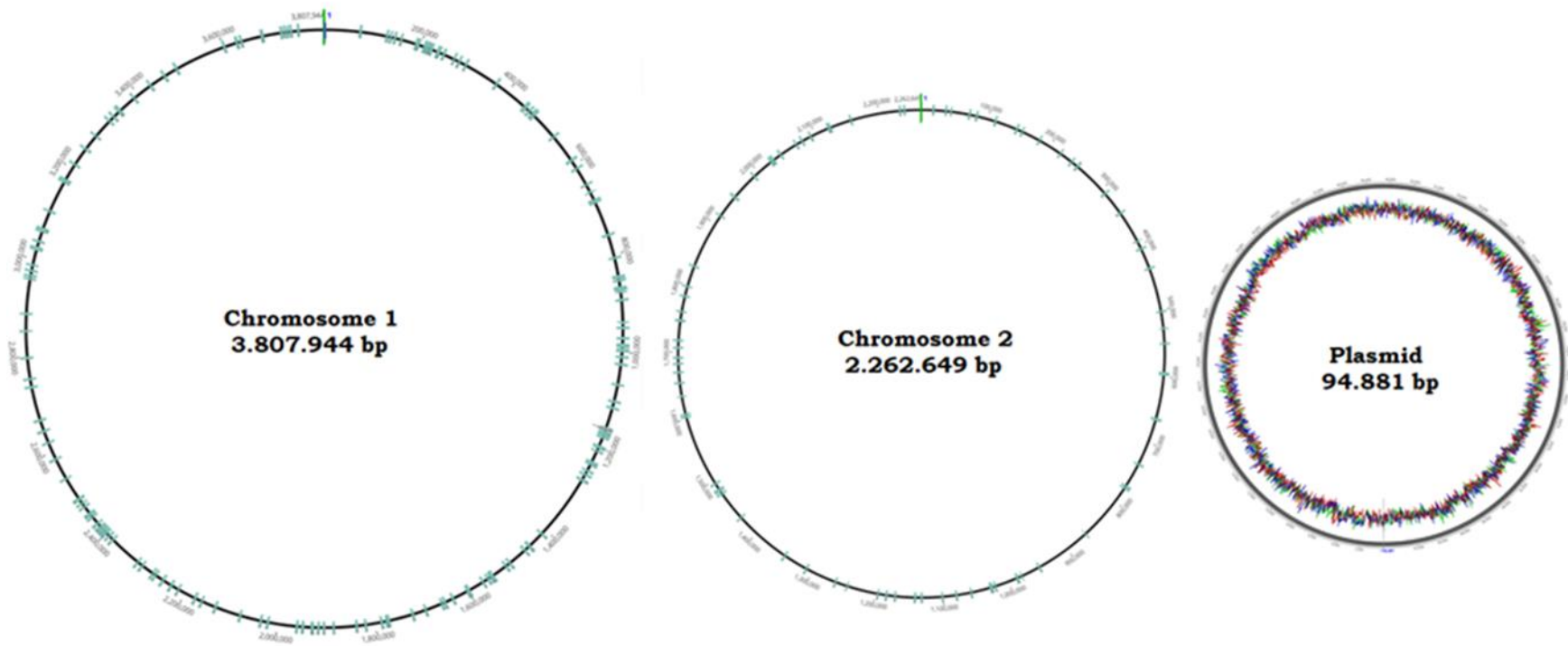
4.5. Rezultati analize genoma

4.5.1. Rezultati sekvenciranja genoma

Sastavljeni su genomi 16 sekvenciranih izolata. Prosječna duljina sastavljenog genoma je 6,218,125 bp. Svi izolati imaju dva kromosoma, prosječna duljina kromosoma 1 je 3,655,726 bp, a kromosoma 2 je 2,322,698. Kromosomi sastavljeni pomoću bioinformatičkih alata su kružni (Slika 6.), no kod nekih izolata primjenom dostupnih alata nije došlo do sastavljanja kromosoma. Kod izolata iz Španjolske (ESP) oba kromosoma su linearna, kod izolata iz Hrvatske (120/19 i 160/19) i Italije (IT-4) kromosomi 1 su linearni, a kromosomi 2 su kružni. Broj kontiga (engl. *Contig*), tj. nizova uzastopnih očitovanja koji se preklapaju varira od izolata do izolata i iznosi od 2 do 8, te su svi veći od 1kb. Guaninsko-citozinski sadržaj (GC sadržaj) koji je bitan zbog stabilnosti DNA iznosi prosječno 44,76%. Na svim dobivenim slijedovima je provedeno sjedinjavanje kojim je dobiven sjedinjen slijed koji je zbog postupka korekcije točniji. Francuski izolati (FR-9 i FR-10), tunižanski (FR-5), španjolski (ESP), turski (TR-2), talijanski (IT-2 i IT-7) te hrvatski izolati (94/17,16/19, A2 i A27) nakon sastavljanja genoma iz očitavanja dobivenih ONT MinION tehnologijom sjedinjeni su slijedovima dobivenim Illumina HiSeq sustavom. Ostali genomi su nakon sastavljanja iz očitavanja dobivenih ONT MinION tehnologijom sjedinjeni očitavanjima dobivenim ONT MinION tehnologijom. Programom BUSCO u sastavljenom genomu pretraženi su slijedovi gena za koje se, s obzirom na tijek evolucije, može očekivati da su prisutni u ispitivanom genomu u jednoj kopiji. Iz rezultata je vidljivo da je prosječna točnost (BUSCO %) između 99,9 do 100% kod genoma koji su sjedinjeni slijedovima dobivenim Illumina HiSeq sustavom, a kod onih koji su sjedinjeni očitavanjima dobivenim ONT MinION tehnologijom, BUSCO je od 61,3% do 76,8%. Utvrđena je prisutnost plazmida kod 12/16 izolata. Plazmidi su kružni (Slika 6.), prosječne veličine 78.808 bp (Tablica 11.).

Tablica 11. Prikaz rezultata dobivenih nakon analize sastavljenih genoma.

Izolat	FR-5	FR-9	FR-10	ESP	TR-2	IT-2	IT-4	IT-5	IT-6	IT-7	IT-8	94/17	120/19	160/19	A2	A27
GC (%)	44,87	44,72	44,86	44,91	44,56	44,86	44,64	44,65	44,56	44,75	44,77	44,75	44,81	44,85	44,90	44,77
Duljina genoma (bp)	6,268,524	6,319,815	5,882,588	6,110,377	6,651,639	6,017,074	6,368,641	6,187,247	6,309,083	6,227,786	6,030,283	6,165,474	6,109,947	6,267,616	6,195,548	6,378,365
Broj kontiga	5	4	2	4	8	3	6	3	5	4	2	3	4	5	5	6
Kromosom 1 (bp)	3,663,359	3,627,682	3,648,598	3,646,950	3,686,748	3,603,099	3,623,452	3,594,698	3,680,699	3,795,750	3,642,481	3,807,944	3,636,855	3,660,864	3,637,917	3,541,117
Kromosom 2 (bp)	2,386,652	2,339,883	2,229,996	2,298,817	2,295,651	2,325,679	2,417,812	2,280,435	2,327,686	2,273,424	2,383,058	2,262,649	2,339,742	2,340,098	2,339,797	2,327,340
Broj kontiga > 10 kb	5	4	2	4	8	3	6	3	5	4	2	3	4	5	5	6
Broj kontiga > 1 kb < 10 kb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Broj kontiga < 1 kb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BUSCO vrijednost (%)	99,9%	100%	99,9%	100%	99,9%	100%	65,8%	75,7%	61,3%	100%	78,8%	99,9%	76,8%	100%	100%	100%
Broj plazmida	3	1	0	0	5	1	4	0	3	2	0	1	1	3	3	1



Slika 6. Grafički prikaz izolata 94/17. Na slici se vidi prikaz kružnih kromosoma 1 i 2 i plazmida te njihove veličine (bp). Na grafičkom prikazu kromosoma tirkiznom bojom su označeni regulatorni elementi sa sličnošću većom od 80% s genomom ATTC 43516 *V. harveyi* iz NCBI baze. Izrađeno pomoću programa Geneious Prime® 2021.2.2.

4.5.2. Rezultati analize prisutnih gena virulencije

Utvrđeni geni virulencije i njihova funkcija u stanici su prikazani u tablici 12. U 16 sekvenciranih izolata utvrđen je ukupno 171 gen virulencije, od ukupnog broja utvrđenih gena njih 150 je prosječno prisutno u svakom izolatu (88%). Od ukupnog broja utvrđenih gena virulencije, 12% što je u prosjeku 21 gen nije prisutno kod svih analiziranih izolata (Slika 7. i 8.).

Nakon analize prisutnih gena virulencije utvrđeno je da neki pretraživani izolati imaju gene: *sitA* (4/16), *sitB* (3/16), *sitC* (4/16) i *sitD* (3/16) koji su važni za transport željeza i *ast* gen (10/16) koji kodira toplinski stabilan citotoksični enterotoksin koji nisu prisutni u drugim bakterija roda *Vibrio* u pretraživanoj bazi podataka VFBD.

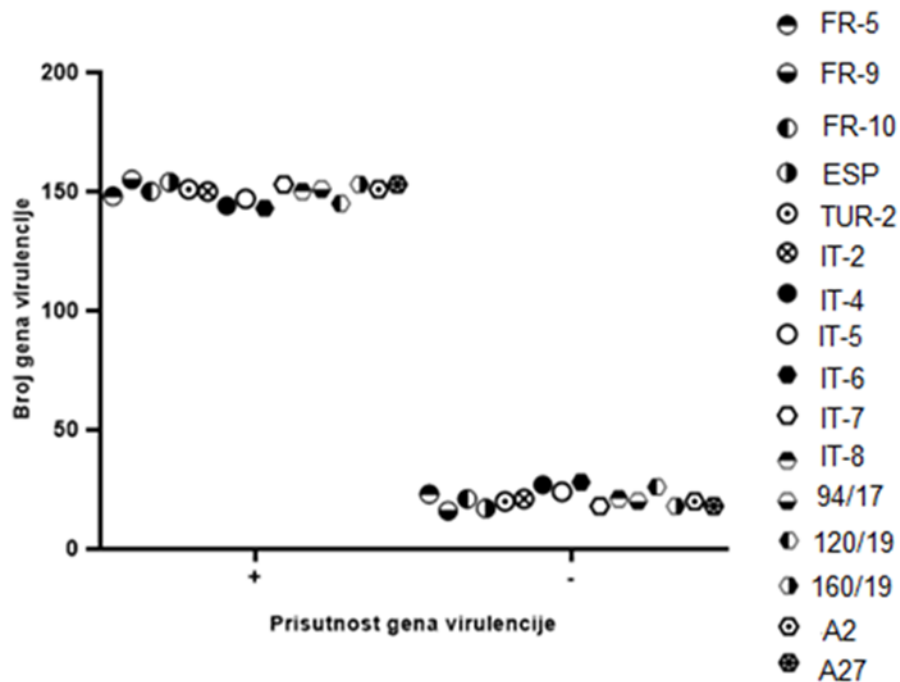
Tablica 12. Prikaz gena virulencije utvrđenih u izolatima bakterije *V. harveyi* nakon analize sekvenci cijelog genoma izolata bakterije *V. harveyi* u bazi podataka VFBD.

Faktori virulencije	Geni
Faktori kolonizacije	<i>acfD</i>
Hemaglutinin osjetljiv na manozu (MSHA* type IV pilus)	<i>mshA, mshB, mshC, mshD, mshE, mshF, mshG, mshH, mshI, mshJ, mshK, mshL, mshM, mshN</i>
Pilus reguliran toksinima (type IVB pilus)	<i>tcpA, tcpB, tcpC, tcpD, tcpE, tcpF, tcpH, tcpI, tcpJ, tcpN/toxT, tcpP, tcpQ, tcpR, tcpS, tcpT</i>
Pillus tip IV	<i>pilA, pilB, pilC, pilD</i>
Kapsularni polisaharid	<i>cpsA, cpsB, cpsC, cpsD, cpsE, cpsF, cpsG, cpsH, cpsI, cpsJ, hp1, rmlA, wbfT, wbfU, wbfV/wcvB, wbfY, wbjD/wecB, wecA, wecC, wza, wzb, wzc</i>
Posjedovanje biča	<i>cheA, cheB, cheR, cheV, cheW, cheY, cheZ, film, flaA, flab, flaC, flaD, flaE, flag, flal, flgA, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, flgl, flgJ, flgK, flgL, flgM, flgN, flhA, flhB, flhF, flhG,fliA, fliD, fliE, fliF, fliG, fliH, fliI, fliJ, fliK, fliL, fliN, fliO, flip, fliQ, fliR, fliS, flrA, flrB, flrC, motA, motB, motX, motY</i>

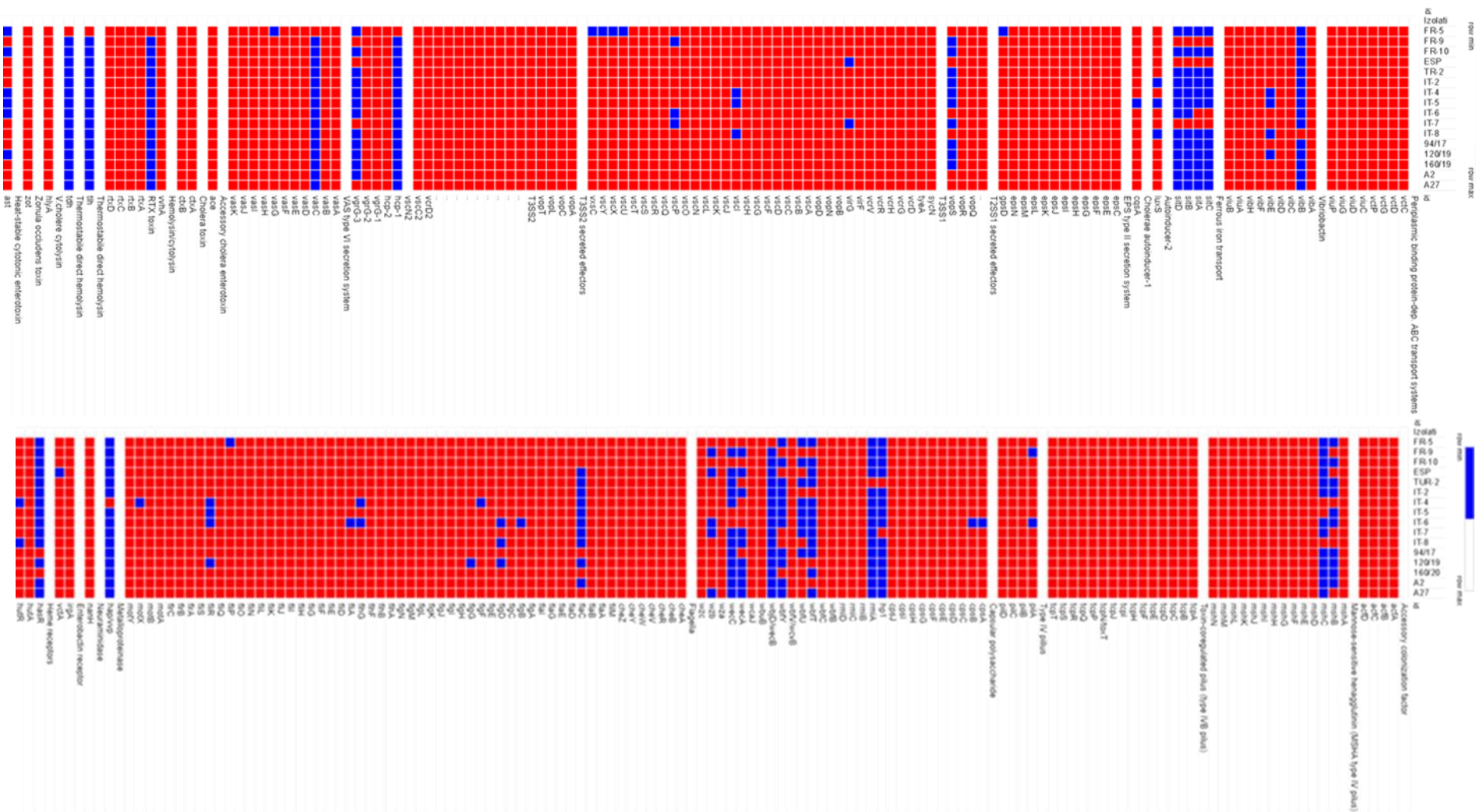
Tablica 12. nastavak

Enterobaktinski receptor	<i>vctA</i> , Heme receptors, <i>hutA</i> , <i>hutR</i>
Receptori za hem	<i>hutA</i> , <i>hutR</i>
ABC transportni sustavi** ovisni o periplazmskom proteinu	<i>vctC</i> , <i>vctD</i> , <i>vctG</i> , <i>vctP</i>
Vibriobaktin	<i>vibB</i> , <i>vibE</i>
Transport željeza	<i>sitC</i> , <i>sitA</i> , <i>sitB</i> , <i>sitD</i>
Autoinduktor – 2	<i>luxS</i>
Cholerae autoinduktor – 1	<i>cqsA</i>
Sustav izlučivanja EPS*** tipa II	<i>epsC</i> , <i>epsE</i> , <i>epsF</i> , <i>epsG</i> , <i>epsH</i> , <i>epsI</i> , <i>epsJ</i> , <i>epsK</i> , <i>epsL</i> , <i>epsM</i> , <i>epsN</i> , <i>gpdD</i>
T2SS1**** efektor lučenja	<i>vopQ</i> , <i>vopR</i> , <i>vopS</i>
T3SS1*****	<i>syncN</i> , <i>tyeA</i> , <i>vcrD</i> , <i>vcrG</i> , <i>vcrH</i> , <i>vcrR</i> , <i>vcrV</i> , <i>virF</i> , <i>virG</i> , <i>vopB</i> , <i>vopN</i> , <i>vopD</i> , <i>vscA</i> , <i>vscB</i> , <i>vscC</i> , <i>vscD</i> , <i>vscF</i> , <i>vscG</i> , <i>vscH</i> , <i>vscI</i> , <i>vscJ</i> , <i>vscK</i> , <i>vscL</i> , <i>vscN</i> , <i>vscO</i> , <i>vscP</i> , <i>vscQ</i> , <i>vscR</i> , <i>vscS</i> , <i>vscT</i> , <i>vscU</i> , <i>vscX</i> , <i>vscY</i> , <i>vxsc</i>
VAS***** efektorski proteini	<i>hcp-1</i> , <i>vgrG-3</i>
VAS sustav izlučivanja tipa VI	<i>vasG</i>
RTX***** toksin	<i>rtxD</i>
Termolabilni hemolizin	<i>tlh</i>
Termolabilni hemolizin	<i>tdh</i>
Toplinski stabilan citotonični enterotoksin	<i>ast</i>

*MSHA engl. *The mannose-sensitive haemagglutinin*, **ATP-vezujući kasetni transporter, ABC transporter, *** EPS – engl. *Extracellular polymeric substances*, ****T2SS1 – sustav izlučivanja tipa II, *****T3SS1 – sustav izlučivanja tipa III, ***** VAS – proteini sustava izlučivanja tipa IV, *****RTX – egzotoksin engl. *Repeats-in-toxin*



Slika 7. Grafički prikaz broja utvrđenih gena virulencije nakon analize sekvenci sastavljenih genoma istraživanih izolata. Znak “+” označava prisustvo gena virulencije a oznaka “-“ odsustvo gena virulencije. Podaci su prikazani pomoću softvera za obradu podataka GraphPad.



Slika 8. Prikaz gena virulencije obrađenih u softveru za analizu Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>). Crvena boja prikazuje prisustvo, a plava boja nedostatak navedenih gena virulencije.

4.5.3. Rezultati analize gena antimikrobne rezistencije

Analizirano je 16 izolata bakterije *V. harveyi* u bazi podataka CARD, koristeći identifikator gena rezistencije RGI. Utvrđena je prisutnost 5 gena rezistencije: *CRP*, *adeF*, *E. coli parE*, *APH(3'')Ib* i *tet(D)* (Tablica 13.)

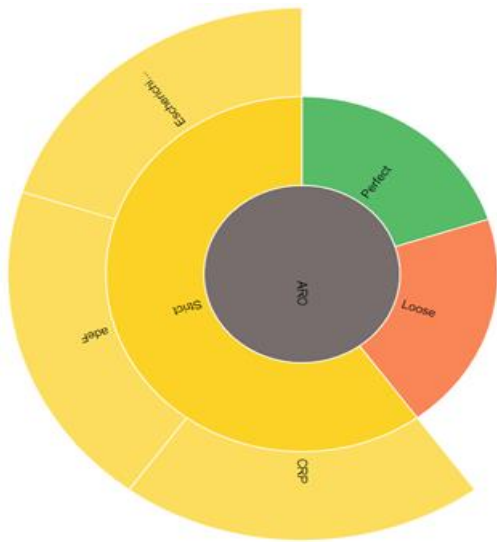
Tablica 13. Prikaz gena antimikrobne rezistencije utvrđene kod pretraživanih izolata *V. harveyi* korištenjem algoritama u bazi podataka CARD, koristeći identifikator gena rezistencije RGI.

Geni antimikrobne rezistencije	Skupina antibiotika na koje je razvijena rezistentnost	Mehanizam djelovanja
<i>CRP</i>	Makrolidi, florkinoloni i penicilini	Izbacivanje (efluks) antibiotika iz stanice
<i>adeF</i>	Florkinoloni i tetraciklini	Izbacivanje (efluks) antibiotika iz stanice
<i>E. coli parE</i>	Florkinoloni i tetraciklini	Izmjena receptora za antibiotike
<i>APH(3'')Ib</i>	Aminoglikozidi	Inaktivacija antibiotika
<i>tet(D)</i>	Tetraciklini	Izbacivanje (efluks) antibiotika iz stanice

Utvrđeno je da je gen *CRP* prisutan kod svih izolata (16/16). Gen *adeF* je prisutan u 81,25% (13/16) ispitanih izolata, nedostaje u jednom izolatu iz Hrvatske (169/19) i dva izolata iz Italije (IT-6 i IT-7). Gen *parE* je prisutan u 68,75% (11/16) ispitanih izolata i nije prisutan u niti jednom hrvatskom (120/19), jednom turskom (IT-5) i tri talijanska izolata (IT-4, IT-6 i IT-8). Geni *APH(3'')Ib* i *tet(D)* su prisutni kod jednog izolata porijeklom iz Turske (IT-5) (Tablica 14. i Slika 9.).

Tablica 14. Prikaz udjela podudarnosti gena antimikrobne rezistencije pretraživanih izolata s referentnim sekvencama nakon analize u bazi podataka CARD, koristeći identifikator gena rezistencije RGI.

IZOLAT	CRP % podudarno s referentnom sekvencom	CRP % podudarno s duljinom referentne sekvence	adeF % podudarno s referentnom sekvencom	adeF % podudarno s duljinom referentne sekvence	parE % podudarno s referentnom sekvencom	parE % podudarno s duljinom referentne sekvence	APH (3'')Ib % podudarno s referentnom sekvencom	APH (3'')Ib % podudarno s duljinom referentne sekvence	tet (D) % podudarno s referentnom sekvencom	tet (D) % podudarno s duljinom referentne sekvence
FR-5	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-
FR-9	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-
FR-10	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-
ESP	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-
TU-2	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-
IT-2	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-
IT-4	95,24	100	43,25	99,15	-	-	-	-	-	-
IT-5	95,24	100	43,25	99,15	-	-	98,88	100	64,15	68,78
IT-6	95,24	100	-	-	-	-	-	-	-	-
IT-7	95,24	100	-	-	78,98	99,37	-	-	-	-
IT-8	95,24	100	43,25	99,15	-	-	-	-	-	-
94/17	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-
120/19	95,24	100	43,06	99,15	-	-	-	-	-	-
160/19	95,24	100	-	-	78,98	99,37	-	-	-	-
A2	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-
A27	95,24	100	43,25	99,15	78,98	99,37	-	-	-	-



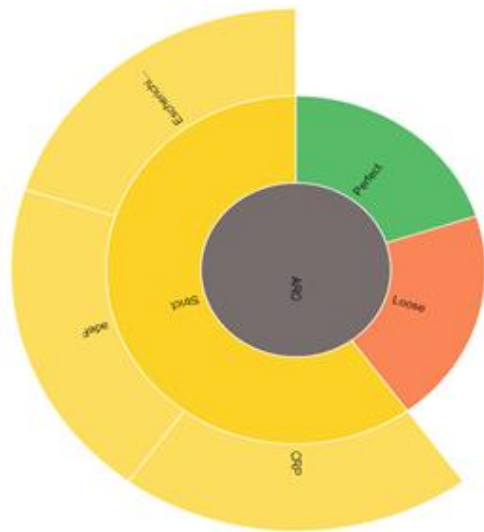
FR-5



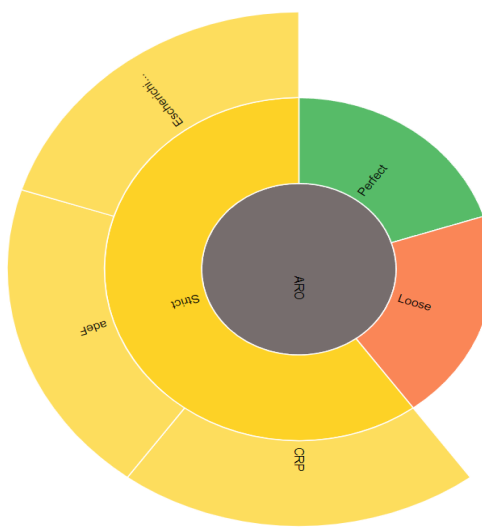
FR-9



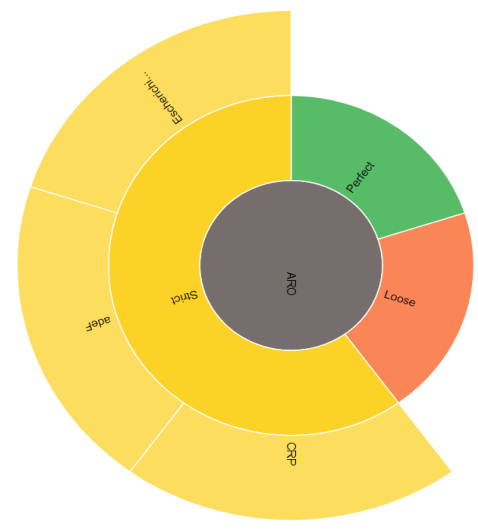
FR-10



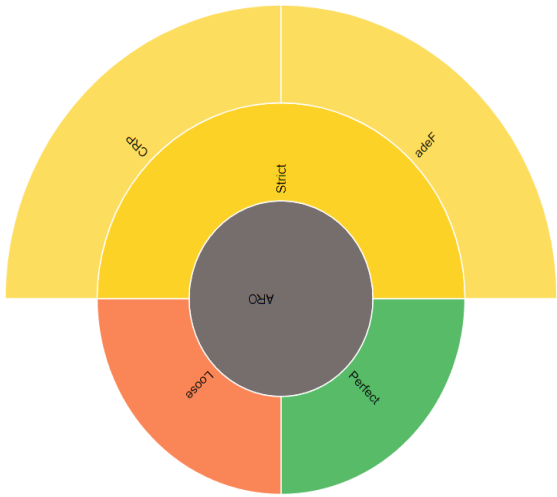
ESP



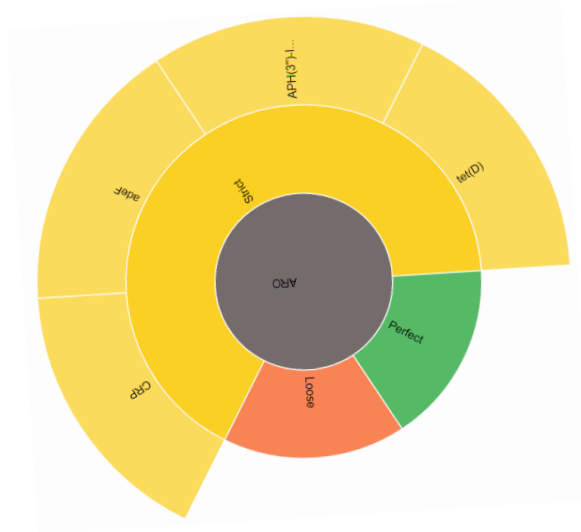
TR-2



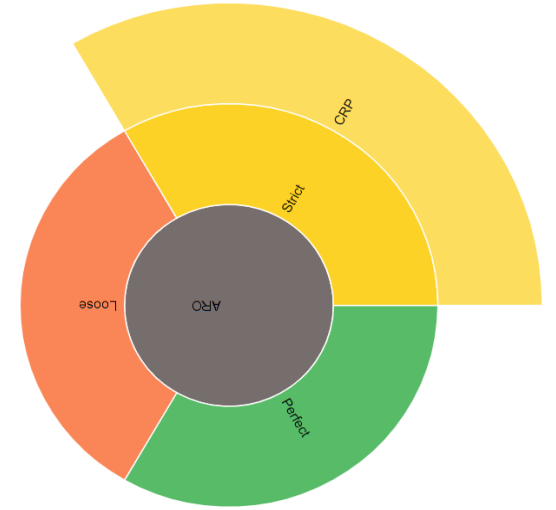
IT-2



IT-4



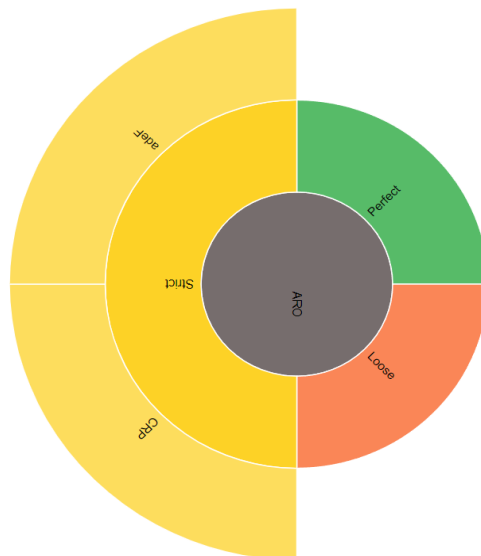
IT-5



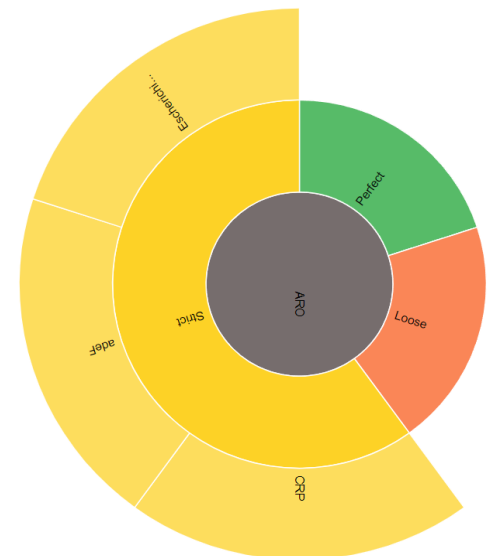
IT-6



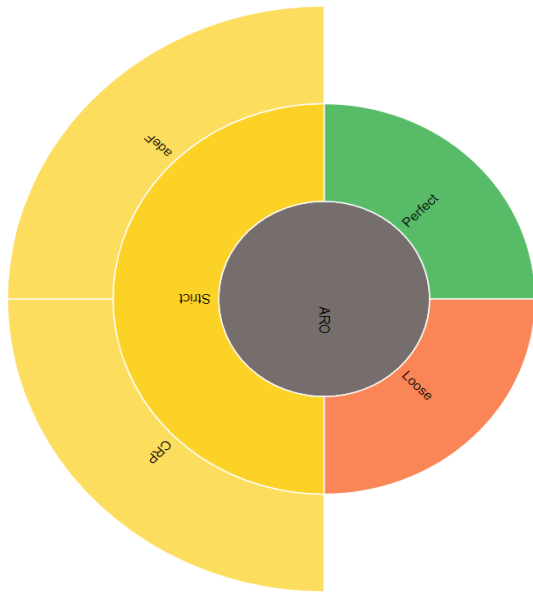
IT-7



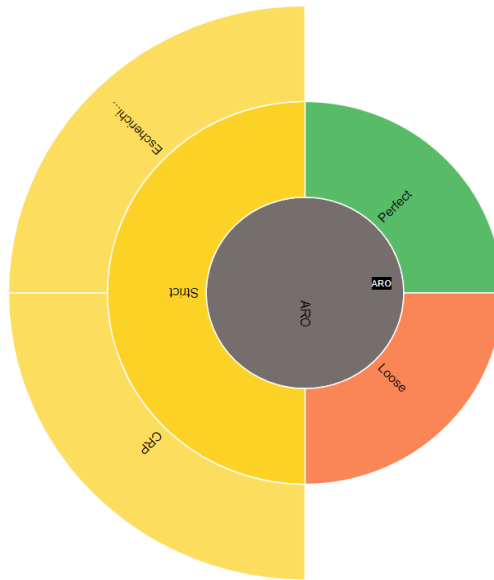
IT-8



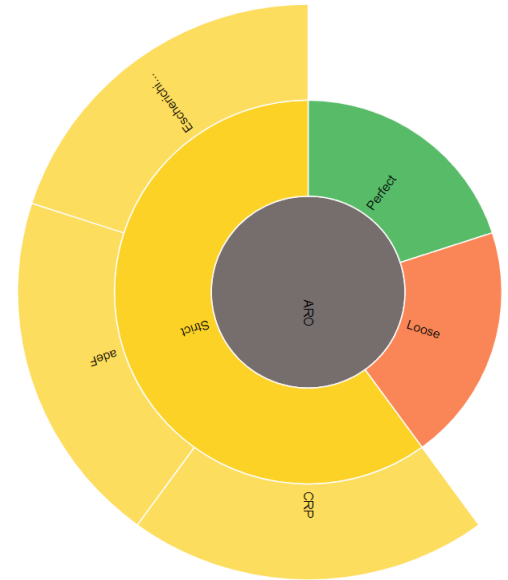
94/17



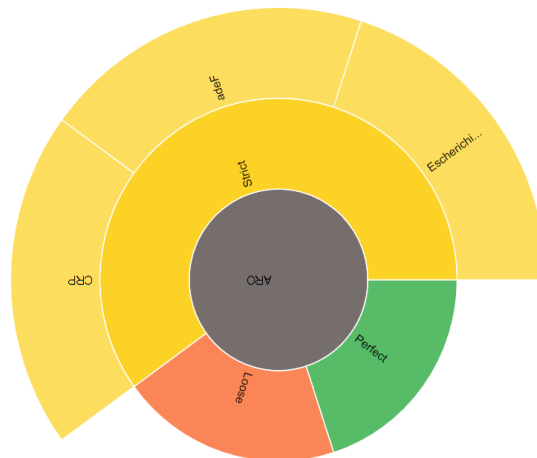
120/19



160/19



A2



A27

Slika 9. Prikaz analize gena antimikrobne rezistencije izolata bakterije *V. harveyi* korištenjem algoritama u bazi podataka CARD, koristeći identifikator gena rezistencije RGI. Analizirani podaci su svrstani u kategorije „perfect“, „strict“ i „loose“. „Perfect“ označava 100% podudaranje pretraživane sekvence duž cijele dužine s referentnom sekvencom, „strict“, označava da pretraživana sekvenca nije u potpunosti identična referentnoj, a „loose“ označava da nema podudaranja pretraživane sekvence s referentnom. Svi ispitivani izolati su svrstani u kategoriju „strict“.

U Tablici 15. je prikazan odnos utvrđenih gena antimikrobne rezistencije i dobivenih vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za antibiotike: enrofloksacin, florfenicol, ampicilin, oksitetraciklin i gentamicin. Antimikrobne tvari čije se minimalne inhibitorne koncentracije koriste za usporedbu su odabrani zbog toga što geni antimikrobne rezistencije koji su prisutni u pojedinim izolatima kodiraju za rezistenciju navedenih antimikrobnih tvari (Tablica 8.). Nakon analize sklopljenih genoma 16 izolata bakterije *V. harveyi* utvrđena je prisutnost 5 gena rezistencije: *CRP*, *adeF*, *E. coli parE*, *APH(3'')Ib* i *tet(D)*. Zabilježeno je da svi pretraživani izolati imaju gen *CRP* te da su osjetljivi na enrofloksacin i florfenikol, međutim svi su rezistentni na ampicilin. Nakon analize rezultata utvrđeno je da trinaest izolata ima *adeF* gen, a pokazuju osjetljivost na florfenikol i oksitetraciklin testom disk difuzije i minimalne inhibitorne koncentracije. Nadalje, jedanaest izolata ima utvrđen gen *parE*, međutim vrijednosti testova disk difuzije i minimalne inhibitorne koncentracije pokazuju osjetljivost tih izolata na florfenikol i oksitetraciklin. Gen *APH(3'')Ib* je prisutan kod jednog izolata, a on pokazuje osjetljivost na testovima disk difuzije i minimalne inhibitorne koncentracije za gentamicin. Samo jedan izolat ima utvrđen *tet(D)*, a testom disk difuzije i minimalne antimikrobne koncentracije je utvrđena njegova rezistentnost na oksitetraciklin.

Tablica 15. Prikaz odnosa utvrđenih gena antimikrobne rezistencije, vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije i zona inhibicije za testirane antimikrobne tvari.

Izolat	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom %	MIC	Enrofloksacin 5µg Zona inhibicije (mm)
FR-5	<i>CRP</i>	95,24	0,12	45
FR-9	<i>CRP</i>	95,24	0,12	45
FR-10	<i>CRP</i>	95,24	0,12	43
ESP	<i>CRP</i>	95,24	0,25	42
TR-2	<i>CRP</i>	95,24	0,12	50
IT-2	<i>CRP</i>	95,24	0,25	41
IT-4	<i>CRP</i>	95,24	0,12	41
IT-5	<i>CRP</i>	95,24	0,5	34

IT-6	CRP	95,24	0,25	46
IT-7	CRP	95,24	0,12	42
IT-8	CRP	95,24	0,5	45
94/17	CRP	95,24	0,06	51
120/19	CRP	95,24	0,25	42
160/19	CRP	95,24	0,25	42
A2	CRP	95,24	0,25	43
A27	CRP	95,24	0,12	47

Tablica 15. nastavak

Izolot	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom %	MIC	Florfenikol 30μg Zona inhibicije (mm)
FR-5	CRP	95,24	4	22
FR-9	CRP	95,24	0,5	41
FR-10	CRP	95,24	0,5	44
ESP	CRP	95,24	0,25	49
TR-2	CRP	95,24	0,5	48
IT-2	CRP	95,24	0,5	47
IT-4	CRP	95,24	0,25	48
IT-5	CRP	95,24	16	19
IT-6	CRP	95,24	0,5	46
IT-7	CRP	95,24	0,5	49
IT-8	CRP	95,24	0,5	50
94/17	CRP	95,24	0,5	50
120/19	CRP	95,24	0,5	46
160/19	CRP	95,24	0,5	40
A2	CRP	95,24	0,5	46
A27	CRP	95,24	0,5	45

Izolat	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom %	MIC	Ampicilin 10µg Zona inhibicije (mm)
FR-5	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
FR-9	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
FR-10	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
ESP	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
TR-2	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
IT-2	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
IT-4	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
IT-5	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
IT-6	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
IT-7	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
IT-8	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
94/17	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
120/19	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
160/19	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
A2	<i>CRP</i>	95,24	<16	0
A27	<i>CRP</i>	95,24	<16	0

Tablica 15. nastavak

Izolat	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom %	MIC	Florfenikol 30µg Zona inhibicije (mm)
FR-5	<i>adeF</i>	43,25	4	22
FR-9	<i>adeF</i>	43,25	0,5	41
FR-10	<i>adeF</i>	43,25	0,5	44

ESP	<i>adeF</i>	43,25	0,25	49
TR-2	<i>adeF</i>	43,25	0,5	48
IT-2	<i>adeF</i>	43,25	0,5	48
IT-4	<i>adeF</i>	43,25	0,25	48
IT-5	<i>adeF</i>	43,25	16	19
IT-6	<i>adeF</i>	-	0,25	46
IT-7	<i>adeF</i>	-	0,5	49
IT-8	<i>adeF</i>	43,25	0,5	50
94/17	<i>adeF</i>	43,25	0,5	50
120/19	<i>adeF</i>	43,25	0,5	46
160/19	<i>adeF</i>	-	0,5	40
A2	<i>adeF</i>	43,25	0,5	46
A27	<i>adeF</i>	43,25	0,5	45

Tablica 15. nastavak

Izolat	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom		MIC	Oksitetraciklin 30 μ g Zona inhibicije (mm)
		%			
FR-5	<i>adeF</i>	43,25	0,25	0,25	36
FR-9	<i>adeF</i>	43,25	0,12	0,12	38
FR-10	<i>adeF</i>	43,25	0,25	0,25	31
ESP	<i>adeF</i>	43,25	0,25	0,25	37
TR-2	<i>adeF</i>	43,25	0,25	0,25	41
IT-2	<i>adeF</i>	43,25	0,25	0,25	35
IT-4	<i>adeF</i>	43,25	0,12	0,12	39
IT-5	<i>adeF</i>	43,25	<4	<4	11
IT-6	<i>adeF</i>	-	0,25	0,25	34
IT-7	<i>adeF</i>	-	0,25	0,25	35
IT-8	<i>adeF</i>	43,25	0,25	0,25	33
94/17	<i>adeF</i>	43,25	0,25	0,25	38

120/19	<i>adeF</i>	43,25	0,12	37
160/19	<i>adeF</i>	-	0,25	34
A2	<i>adeF</i>	43,25	0,25	36
A27	<i>adeF</i>	43,25	0,25	34

Tablica 15. nastavak

Izolat	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom %	MIC	Florfenikol 30µg Zona inhibicije (mm)
FR-5	<i>parE</i>	78,98	4	22
FR-9	<i>parE</i>	78,98	0,5	41
FR-10	<i>parE</i>	78,98	0,5	44
ESP	<i>parE</i>	78,98	0,25	49
TR-2	<i>parE</i>	78,98	0,5	48
IT-2	<i>parE</i>	78,98	0,5	48
IT-4	<i>parE</i>	-	0,25	48
IT-5	<i>parE</i>	-	16	19
IT-6	<i>parE</i>	-	0,6	46
IT-7	<i>parE</i>	78,98	0,5	49
IT-8	<i>parE</i>	-	0,25	50
94/17	<i>parE</i>	78,98	0,5	50
120/19	<i>parE</i>	-	0,5	46
160/19	<i>parE</i>	78,98	0,5	40
A2	<i>parE</i>	78,98	0,5	46
A27	<i>parE</i>	78,98	0,5	45

Tablica 15. nastavak

Izolat	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom %	MIC	Oksitetraciklin 30µg Zona inhibicije (mm)
FR-5	<i>parE</i>	78,98	0,25	36
FR-9	<i>parE</i>	78,98	0,12	38
FR-10	<i>parE</i>	78,98	0,25	31
ESP	<i>parE</i>	78,98	0,25	37
TR-2	<i>parE</i>	78,98	0,25	41
IT-2	<i>parE</i>	78,98	0,25	35
IT-4	<i>parE</i>	-	0,12	39
IT-5	<i>parE</i>	-	<4	11
IT-6	<i>parE</i>	-	0,25	34
IT-7	<i>parE</i>	78,98	0,25	33
IT-8	<i>parE</i>	-	0,25	33
94/17	<i>parE</i>	78,98	0,25	38
120/19	<i>parE</i>	-	0,12	37
160/19	<i>parE</i>	78,98	0,25	34
A2	<i>parE</i>	78,98	0,25	36
A27	<i>parE</i>	78,98	0,25	34

Izolat	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom %	MIC	Gentamicin 10µg Zona inhibicije (mm)
FR-5	<i>APH(3'') Ib</i>	-	1	20
FR-9	<i>APH(3'') Ib</i>	-	2	23

FR-10	APH(3'') Ib	-	2	25
ESP	APH(3'') Ib	-	2	20
TR-2	APH(3'') Ib	-	1	28
IT-2	APH(3'') Ib	-	2	19
IT-4	APH(3'') Ib	-	2	23
IT-5	APH(3'') Ib	98,88	2	20
IT-6	APH(3'') Ib	-	2	22
IT-7	APH(3'') Ib	-	2	20
IT-8	APH(3'') Ib	-	2	24
94/17	APH(3'') Ib	-	2	25
120/19	APH(3'') Ib	-	2	22
160/19	APH(3'') Ib	-	2	18
A2	APH(3'') Ib	-	2	23
A27	APH(3'') Ib	-	1	22

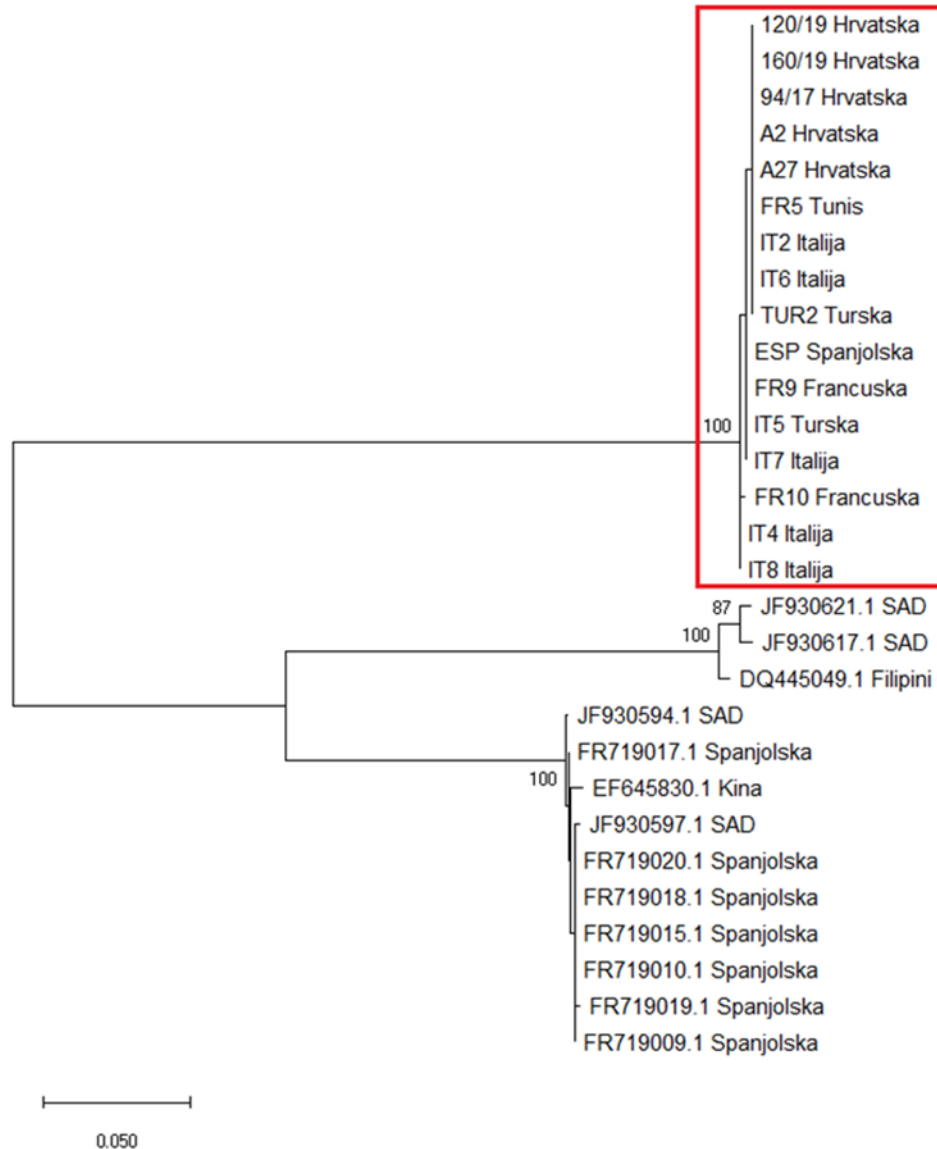
Tablica 15. nastavak

Izolot	Geni antimikrobne rezistencije	Podudarno s referentnom sekvencom %	MIC	Oksitetraciklin 30µg Zona inhibicije (mm)
FR-5	<i>tet(D)</i>	-	0,25	36
FR-9	<i>tet(D)</i>	-	0,12	38
FR-10	<i>tet(D)</i>	-	0,25	31
ESP	<i>tet(D)</i>	-	0,25	37
TR-2	<i>tet(D)</i>	-	0,25	41
IT-2	<i>tet(D)</i>	-	0,25	35
IT-4	<i>tet(D)</i>	-	0,12	39
IT-5	<i>tet(D)</i>	64,15	<4	11
IT-6	<i>tet(D)</i>	-	0,25	34
IT-7	<i>tet(D)</i>	-	0,25	35
IT-8	<i>tet(D)</i>	-	0,25	33

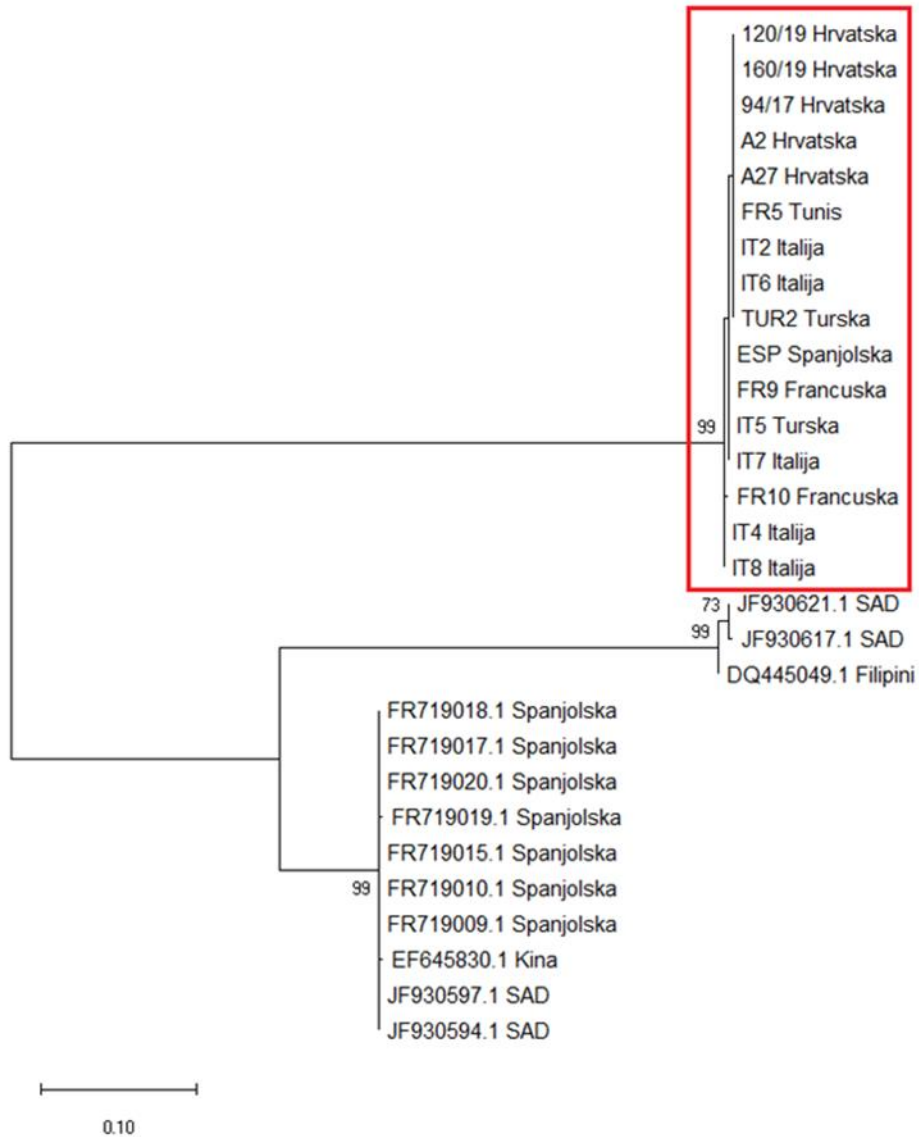
94/17	<i>tet(D)</i>	-	0,25	38
120/19	<i>tet(D)</i>	-	0,12	37
160/19	<i>tet(D)</i>	-	0,25	34
A2	<i>tet(D)</i>	-	0,25	36
A27	<i>tet(D)</i>	-	0,25	34

4.6. Filogenetska analiza

Filogenetska stabla su rekonstruirana za 16 izolata koji su sekvencirani ONT MinION tehnologijom. Filogenetska analiza koja se temeljila na odsječku gena *toxR* pokazala je jasno odvajanje i grupiranje vrsta na filogenetskom stablu (Slika 10. i 11.). Iz odnosa na filogenetskom stablu jasno se raspoznaju 3 glavne skupine. Iz topologije filogenetskih stabala dobivenih metodom povezivanja susjeda i najveće vjerovatnosti vidljivo je da su istraživani izolati prikupljeni u području Sredozemlja srodni. Dobivena filogenetska stabla pokazuju da su se svi istraživani izolati odvojili u jednu filogenetsku skupinu. Jasno odvajanje potkrijepljuju i visoke vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja koja za filogenetski odvojene skupine vrsta iznosi 100. Na filogenetskim stablima se može vidjeti kako se sekvence odsječka gena *toxR* preuzete iz GenBank banke gena, odvajaju u dvije skupine unutar kojih su prisutne male razlike, što je potkrijepljeno vrijednostima samoučitavanja koje iznose 100.



Slika 10. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog analizom gena *toxR* primjenom metode povezivanja susjeda. Filogenetska analiza je obuhvatila sekvence pretraživanih izolata koji su uokvireni crvenom bojom, a uz oznaku izolata dodana je i država iz koje izolat potječe. Uključene su i dostupne sekvence preuzete iz GenBank, banke gena koje su označene pristupnim brojevima, a zemlja podrijetla se nalazi iza imena. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja. Prikazane su samo vrijednosti veće od 70%.



Slika 11. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog analizom gena *toxR* primjenom metode najveće vjerojatnosti. Filogenetska analiza je obuhvatila sekvence istraživanih izolata koji su uokvireni crvenom bojom, a uz oznaku izolata dodana je i država iz koje izolat potječe. Uključene su i dostupne sekvence preuzete iz GenBank banke gena koje su označene pristupnim brojevima, a zemlja podrijetla se nalazi iza imena. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja. Prikazane su samo vrijednosti veće od 70%.

5. RASPRAVA

V. harveyi je široko rasprostranjena morska bakterija odgovorna za pojavu bolesti u više vrsta gospodarski važnih riba, mekušaca i rakova. *V. harveyi* je primarno opisan kao uvjetni (ili sekundarni) uzročnik bolesti, budući da se najteži oblici bolesti javljaju kod imunosuprimiranih ili stresu izloženih domaćina. Posljednjih godina sve više preuzima ulogu primarnog uzročnika bolesti, a opisani su i slučajevi bolesti u ljudi. Klinički znakovi variraju ovisno o zaraženoj vrsti (Austin i Zhang, 2006; Travers i sur., 2009; Ruwandeeepika i sur., 2012; Zhu i sur., 2018).

Iako dobro poznat kao uzročnik bolesti u akvakulturi suptropskih i tropskih akvakultura istočne i jugoistočne Azije u posljednjih petnaestak godina postaje sve važniji u sredozemnoj akvakulturi lubina i komarče. Amaro i sur. (2020) povezuju učestalu pojavu infekcija *V. harveyi* s globalnim zatopljenjem. Zbog važnosti za tropsku i suptropsku akvakulturu, najveći broj istraživanja i saznanja o svojstvima ove bakterije je vezan za azijsku akvakulturu dok su publikacije koje karakteriziraju *V. harveyi* podrijetlom iz Sredozemlja rijetke. Stoga rezultati prikazani u ovoj disertaciji prema saznanjima autora predstavljaju najopsežniji prikaz biokemijskih i genetskih osobitosti sredozemnih izolata.

Prikazano istraživanje je obuhvatilo ukupno 39 izolata bakterije *V. harveyi* izdvojenih iz oboljelih lubina i komarči s različitih lokacija diljem Sredozemlja, ali i onih koji nisu pokazivali kliničke znakove bolesti. Prije početka istraživanja potvrđeno je da svi korišteni izolati pripadaju vrsti *V. harveyi*. *V. harveyi* je genetski varijabilan i uključuje avirulentne i virulentne izolate, a virulentni izolati se uglavnom povezuju s klinički izraženim znakovima bolesti u ribogojilištima (Austin i Zhang, 2006; Halder i sur., 2010; Ruwandeeepika i sur., 2012).

Rezultati analize morfoloških i tinktorijelnih svojstava svih pretraživanih izolata su pokazali da su svi izolati Gram-negativni, blago zakrivljeni pokretljivi štapići i da imaju svojstvo tvorbe oksidaze i katalaze te imaju fermentacijski metabolizam glukoze kako je sredozemne izolate opisao Pretto (2018). Svi izolati na krvnom agaru pokazuju α – hemolizu, osim dva izolata kod kojih hemoliza nije bila prisutna (γ – hemoliza) što je u skladu s očekivanim rezultatima dostupnim u literaturi (Austin i Austin, 2012). *V. harveyi* pokazuje rast na temperaturama od 15 °C do 37 °C, ali ne raste na temperaturi ispod 4 °C za razliku od drugih vrsta bakterija roda *Vibrio* patogenih za sredozemne vrste riba. Tako *V. alginolyticus* raste na temperaturama od 5 °C

do 42 °C (Farid i Larsen, 1981), a *V. anguillarum* raste na temperaturama od 10 °C do 42 °C (Guérin-Faubleé i sur., 1995).

Generalizirana infekcija je karakterizirana neurološkim sindromom koji se očituje neuravnoteženim plivanjem, simptomom koji diferencijalno dijagnostički zahtijeva isključenje virusne encefalopatije i retinopatije, bolesti uzrokovane betanodavirusom, a koja se javlja pri istim temperaturama kao i vibriosa uzrokovana bakterijom *V. harveyi* (Padrós i sur., 2022; Zrnčić i sur., 2022). Ova činjenica ukazuje da bi vibriosa uzrokovana ovom vrstom vibriosa mogla biti povezana s globalnim zatopljenjem budući da su opisane najteže kliničke slike i najveći udio smrtnosti pri temperaturama višim od 20 °C koje su optimalne za opstanak i postojanost *V. harveyi* u morskoj vodi (Amaro i sur., 2020). Zapravo, povišene temperature se često povezuju s učestalim pojavnostima bolesti koje mogu imati ozbiljne ekonomske posljedice na cijeli sektor akvakulture, ali mogu biti i potencijalno opasne za zdravlje ljudi. Poznati su primjeri infekcije *V. harveyi* u imunokompromitiranih ljudi nakon boravka u područjima s višim temperaturama mora i oceana (Pavia i sur., 1989; Wilkins i sur., 2008; Hundenborn i sur., 2013). Povećanje temperature vode, zajedno s visokom gustoćom nasada tipičnom za sustave intenzivne proizvodnje ribe, kao što je kavezni uzgoj, može dovesti do povećane učestalosti i intenziteta izbijanja bolesti (Cascarano i sur., 2021).

Svi istraživani izolati su rasli u peptonskoj vodi s dodatkom 0,5 do 6% soli dok niti jedan izolat *V. harveyi* nije rastao u peptonskoj vodi s 10% soli što se podudara s prije opisanim svojstvima (Austin i Austin, 2012). Utvrđena sposobnost umnažanja u mediju s nižim koncentracijama soli ukazuje na mogućnost pojave bolesti i u područjima nižeg saliniteta i u boćatim vodama (Bauer i sur., 2020).

Biokemijska analiza izolata *V. harveyi* izdvojenih iz lubina i komarče pokazala je relativno homogeni profil koji je usporediv s podacima koje opisao Pretto (2018). Razlike u biokemijskim svojstvima među izolatima zabilježene su u detekciji lizin dekarboksilaze koju ne posjeduju tri izolata (7,7%), od kojih su dva izolata iz područja srednjeg Jadrana i jedan izolat iz srednjeg Jadrana. Osam izolata (20,5%), od kojih dva iz sjevernog te šest porijeklom iz srednjeg Jadrana ne posjeduju triptofan deaminazu. Sedam izolata (17,9%), od kojih je šest uzorkovano na području srednjeg Jadrana i jedan na području sjevernog Jadrana nije sposobno razgraditi aminokiselinu triptofan u indol. Od svih ispitanih izolata šest, (15,4%) ne može iskoristiti citrat, pet je iz područja srednjeg Jadrana te jedan iz područja sjevernog Jadrana. Utvrđeno je petnaest

(38,5%) izolata koji posjeduju ornitin dekarboksilazu, četiri porijeklom iz srednjeg Jadrana, dva iz sjevernog Jadrana, tri porijeklom iz Francuske, dva porijeklom iz Turske, dva porijeklom iz Tirenskog mora, jedan iz Jonskog mora te jedan iz Tunisa. Utvrđeno je devetnaest (48,7%) izolata koji posjeduju želatinazu, šest iz područja Sjevernog Jadrana, četiri iz srednjeg Jadrana, tri iz Tirenskog mora, dva iz Turske, jedan iz Cipra, jedan iz Španjolske, jedan iz Francuske i jedan iz Jonskog mora. Ukupno je devet (23%) izolata koji ne fermentiraju sorbitol, četiri iz srednjeg Jadrana, dva iz sjevernog Jadrana, jedan iz Tirenskog mora i jedan iz Turske. Iz unaprijed opisane distribucije biokemijskih svojstava pojedinih izolata uključenih u istraživanje, razvidno je da varijabilnost u enzimatskim svojstvima nikako ne ovisi o geografskom porijeklu izolata. Nadalje, poznato je da *V. harveyi* ima vrlo slična biokemijska svojstva kao *V. alginolyticus* (Themptander, 2005) te je ponekad moguće na temelju biokemijskog profila previdjeti infekciju bakterijom *V. harveyi*, te se dijagnostika ne može temeljiti isključivo na određivanju biokemijskih svojstava.

Metoda koja predstavlja zlatni standard za identifikaciju bakterijskih vrsta općenito je sekvenciranje odsječka *16S rRNA* gena (Chatterjee i Halder, 2012). Međutim, nekoliko istraživanja je utvrdilo i naglasilo nedostatnu mogućnost razlikovanja pojedinih *Vibrio* vrsta identifikacijom temeljenom na sekvenciranju odsječka *16S rRNA*, zbog velike sličnosti njihovih genoma (Gomez-Gil i sur., 2004; Hernandez i Olmos, 2004). Naša su istraživanja potvrdila spomenutu tvrdnju činjenicom da su neki od istraživanih izolata iz roda *Vibrio* biokemijskim metodama i *16S rRNA* sekvenciranjem identificirani kao *V. harveyi*, ali je utvrđeno da nisu umnožili odsječak gena *toxR*, karakterističan baš za vrstu *V. harveyi* (Pang i sur., 2006). Stoga je u ovim istraživanjima pripadnost pretraživanih izolata rodu *Vibrio* potvrđena sekvenciranjem gena *16S rRNA*, a pripadnost vrsti *V. harveyi* utvrđivana je umnožavanjem odsječka gena *toxR*. *ToxR* geni su univerzalno prisutni u porodici *Vibrionaceae*, a nukleotidni slijedovi odražavaju njihov filogenetski odnos (Lin i sur., 1993; Osoril i Klose 2000). Ovaj gen se smatra učinkovitim taksonomskim markerom za identifikaciju *Vibrio* spp. (Kim i sur., 1999). Međutim pomoću specifično dizajniranih početnica za *toxR* gen *V. harveyi* amplificira se produkt PCR reakcije veličine 382 bp (Pang i sur., 2006) koji je specifičan za brzu detekciju ove bakterije bez potrebe za sekvenciranjem. Za razliku od *toxR* gena, *pyrH* gen je specifičan za bakterije roda *Vibrio*, ali je potrebno sekvencirati umnožene produkte da bi se sa sigurnošću moglo tvrditi o kojoj se vrsti

roda *Vibrio* radi, te stoga ne predstavlja prednost nad sekvenciranjem odsječka *16S rRNA* gena (Pascual i sur., 2010; Preto, 2018).

Za određivanje serotipa odabrano je 29 izolata bakterije *V. harveyi* iz različitih područja Sredozemlja. Prema poznatoj klasifikaciji *V. harveyi* se svrstava u tri serovara: A, B i C (Pavlinec i sur., 2022). Amaro i sur. (2020) opisuju da su izolati bakterije *V. harveyi* izdvojeni iz oboljelog lubina serološki heterogeni, te se čini se da su tri serotipa dominantna. Ovo istraživanje nije potvrdilo navedenu distribuciju te je utvrđeno da 31% izolata (10/29) pripada serotipu A, 10,3% (3/29) izolata pripadaju serotipu B, 13,7% (4/29) izolata pripadaju serotipu C, a najviše izolata, njih 38% (12/29) ne pripada ni jednom od dosada poznatih serotipova. Izolati A2 i A27 su izdvojeni iz crijeva lubina koji nije pokazivao kliničke znakove bolesti te pripadaju različitim serotipovima. Jedan (A27) pripada serotipu B, a drugi (A2) ne pripada niti jednom od tri poznata serotipa. Nije utvrđena korelacija pojedinog serotipa s prisutnošću gena virulencije ili antimikrobne rezistencije za razliku od drugih vrsta roda *Vibrio*. Tako je poznato da su kod bakterije *V. anguillarum*, važnog uzročnika bolesti u morskom okolišu utvrđena 23 različita serotipa (O1-O23) (Manfrin, 2020), i dok su serotipovi O1 i O2 prepoznati kao patogeni, ostali su okolišni serotipovi. Temeljem navedenih činjenica očito je da su potrebna daljnja, mnogo opsežnija istraživanja različitih izolata *V. harveyi* i iz oboljelih riba i iz okoliša kako bi se preciznije moglo odrediti odgovarajuće serotipove i naći sličnosti u patogenosti ili drugim svojstvima.

Poznato je da se antibiotici vrlo često koriste za kontrolu ili liječenje bakterijskih bolesti u akvakulturi (Santos i Ramos, 2018). Primjena antibiotika u kaveznom uzgoju se prema klasifikaciji World Health Organization (2004) kategorizira kao metafilaksa što podrazumijeva liječenje cijelog kaveza sa ciljem izliječenja bolesnih primjeraka. Na taj način se sprječava širenje infekcije na zdrave ribe, ali i liječenje onih koje su već subklinički zaražene. Regulatorni okvir uporabe antibiotika u akvakulturi ograničen je i uvelike se razlikuje među zemljama te je dosta restriktivan u zemljama EU (Regulation of the European Parliament and of the Council, 2019). Intenzivna i učestala upotreba antibiotika pogoduje taloženju ostataka antibiotika u tkivu uzgajanih riba i u okolišu te razvoju antimikrobne rezistencije (Liang i sur., 2013). Zbog uvida u mogući razvoj rezistencije u područjima podrijetla izolata, svi izolati uključeni u istraživanje su testirani *in vitro* metodom disk difuzije i metodom mikrodilucije određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija na jedanaest antibiotika koji su svrstani u devet različitih skupina. Oba

testa su pokazala da su svi izolati rezistentni na ampicilin. Istraživanja provedena na hibridima škarpine pokazala su višestruku rezistenciju bakterije *V. harveyi* na peniciline (Shen i sur., 2017; Zhu i sur., 2018), a isti rezultati su dobiveni i testiranjem osjetljivosti dva izolata izdvojena iz morske vode, uzorkovana u blizini farmi školjkaša u Koreji (Kang i sur., 2014). Poznato je da je bakterija *V. harveyi* rezistentna na ampicilin (Nakayama i sur., 2006), smatra se da je to urođena rezistentnost, a mehanizmi nisu u potpunosti poznati. Ampicilin pripada u skupinu penicilina, a najvažniji mehanizam rezistencije na peniciline je hidroliza antibiotika posredovana bakterijskim enzimom beta-laktamazom (Lobanovska i sur., 2017). Teo i sur. (2000) su objavili da je za rezistenciju na beta-laktamske antibiotike kod bakterije *V. harveyi* odgovoran *bla* gen te da bakterija sadrži plazmid veličine 60 kb u kojem *bla* gen nije lociran, što može upućivati da su geni odgovorni za rezistenciju na ovaj antibiotik smješteni na kromosomima. Testovima disk difuzije i mikrodilucije je utvrđena rezistentnost dva izolata iz Francuske, jednog sa Cipra i jednog iz Turske na sulfametoksazol što može upućivati da su ribe iz kojih je bakterijski izolat izdvojen liječene ovom antimikrobnom tvari. Nadalje određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije utvrđena je rezistentnost dva izolata porijeklom iz Turske i Cipra na sve koncentracije oksitetracilina, iako isti rezultat nije dobiven testom disk difuzije, ali je veličina zona inhibicije za ova dva izolata bila puno manja nego kod ostalih testiranih izolata. Treba napomenuti da za bakteriju *V. harveyi* ne postoje utvrđene granične vrijednosti za pojedine antibiotike, stoga se rezultati ne mogu tumačiti kao osjetljiv, srednje osjetljiv ili rezistentan. U tijeku je istraživanje u kojem nekoliko laboratorija testira osjetljivost vlastitih izolata bakterije *V. harveyi* primjenom istovjetne metodologije. Rezultati istraživanja će doprinijeti standardizaciji i validaciji protokola za *in vitro* određivanje osjetljivosti testovima disk difuzije i mikrodilucije određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije, te određivanju graničnih vrijednosti osjetljivosti i interpretativnih kriterija (Smith, 2022, osobno priopćenje).

Sekvenciranjem 16 izolata odabranih prema geografskom podrijetlu ONT MinION i Illumina HighSeq tehnologijom dobiveni su podaci koji su poslužili za sastavljanje njihovih genoma. Utvrđeno je da je prosječna duljina sastavljenog genoma 6,218,125 bp, da svi izolati imaju dva kromosoma, te da je prosječna duljina kromosoma 1 3,655,726 bp, a kromosoma 2 2,322,698 što je sukladno rezultatima istraživanja Wanga i sur. (2015). Kromosomi sastavljeni primjenom bioinformatičkih alata su kružni, osim kod nekih izolata kod kojih koristeći dostupne alate to nije moglo biti utvrđeno. Guaninsko-citozinski sadržaj bitan zbog stabilnosti DNA iznosi prosječno

44,76% što odgovara rezultatima koje su opisali Tu i sur. (2017). U dvanaest analiziranih izolata je utvrđena prisutnost plazmida, koji su kružni i prosječne veličine 78,808 bp. Tu i sur. (2017) navode da nevirulentni izolati *V. harveyi* mogu postati virulentni nakon unosa plazmida ili prijenosa gena za toksine posredovanog bakteriofagom što donekle objašnjava prisustvo nevirulentnih i virulentnih izolata vrlo sličnih biokemijskih i seroloških svojstava.

Filogenetska analiza provedena u ovom istraživanju temeljena je na odsječku gena *toxR* koji je specifičan za bakterije vrste *V. harveyi*. Rekonstruirana su filogenetska stabla 16 izolata korištenih u ovom istraživanju, porijeklom iz Sredozemlja te sekvenci odsječaka *toxR* gena porijeklom iz Filipina, Kine, SAD-a i Španjolske, dostupnih u banci gena. Iz analize se jasno može zaključiti da su se izolati proučavani u ovom istraživanju grupirali u odvojenu filogenetsku skupinu te da su srodni.

Usporedbom različitih izolata izdvojenih iz ribe koja je pokazivala kliničke znakove bolesti i onih iz riba bez simptoma bolesti utvrđeni su slični geni virulencije. Poznavanje virulencije i osjetljivosti na antimikrobna sredstva predstavlja nužne elemente na temelju kojih će se kreirati mjere kontrole bolesti, jednako mjere biosigurnosti i prevencije bolesti. Ukoliko mjere biosigurnosti izostanu bitna mjera uspješne kontrole bolesti je odgovorno i razborito liječenje antimikrobnim tvarima tako da se ne generira antimikrobna rezistentnost i negativan utjecaj na okoliš. Kao što je već spomenuto od 39 izolata proučavanih u ovom istraživanju, 16 je izolata sekvencirano i sklopljen je njihov genom. Ukupno je utvrđen 171 gen virulencije, a od ukupnog broja u svakom od ispitivanih izolata je prosječno prisutno 150 gena virulencije. Gen *AcfD* je prisutan kod svih ispitivanih izolata. To je gen koji kodira komponente faktora kolonizacije (engl. *Accessory Colonization Factor*, ACF). Točna uloga ACF-a u patogenezi nije jasna, ali je poznato da je potreban bakteriji *V. cholerae* za učinkovitu kolonizaciju tankog crijeva (Peterson i Mekalanos, 1988), poznato je da tipičan nalaz razudbe uključuje karakteristične promjene u crijevima ribe zaražene *V. harveyi*. Ruwandeepika i sur. (2010) navode osam tipičnih gena virulencije za bakteriju *V. harveyi*, a to su: *luxR*, *toxR*, *vhpA*, *chiA*, *SP*, *vhml* i *vhs*. U genomima izolata korištenih u ovom istraživanju nisu prisutni: *luxR*, *vhpA*, *chiA*, *SP*, *vhml* i *vhs*. Prisutan je gen *luxS*. *LuxS* je izvorno otkriven kod bakterije *V. harveyi* kao dio međustanične komunikacije koji regulira ekspresiju gena luminescencije (Surette i sur., 1999). Osim tipičnih gena Ruwandeepika i sur. (2010) navode i atipične gene karakteristične za bakteriju *V. harveyi*, a to su: *zot*, *toxRVc*, *tcpA*, *ctxA*, *hlyA*, *flaC*, *tdh*, *trh* i *vvh*. Od atipičnih gena u izolatima pretraživanim u

ovom istraživanju prisutni su *tdh* i *tcp* geni koji kodiraju hemolizine koji su snažni toksini s hemolitičkim i citolitičkim učinkom te igraju važnu ulogu u virulenciji (Zhang i Austin, 2005) i razvoju kliničke slike koja se manifestira brojnim krvarenjima po koži i unutarnjim organima. U genomu izolata prisutan je i atipični gen *flaC*, važan za pokretanje bakterija. Bičevi su također odgovorni za virulenciju kod nekih bakterija iz porodice *Vibrionaceae*. Opisano je da su kod *V. cholerae* pokretni izolati virulentniji od nepokretnih mutanata (Richardson, 1991). Bai i sur. (2008) su otkrili da je gen za posjedovanje biča *flaC* široko rasprostranjen u bakterijama *V. anguillarum*, *V. aestuarianus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. cincinnatiensis*, *V. fischeri*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. netriegenis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagia* i *V. harveyi* te da nije povezan s mogućnošću infekcije. U ovom istraživanju gen *flaC* bio je prisutan u 37,5% testiranih izolata. U istraživanju koje su proveli Ruwandeepika i sur. (2010) utvrđeno je da je *flaC* gen prisutan u trećini izolata *Harveyi* monofiletske skupine što odgovara i našim rezultatima. Međutim, u istraživanju pokretljivosti utvrdili smo da su svi istraživani izolati pokretljivi te izgleda je da su i neki drugi geni koji nisu detektirani kao odgovorni za pokretljivost uključeni u regulaciju tog svojstva. Isti autori navode da se taj gen prenosi horizontalno što doprinosi povećanju virulencije prema određenom domaćinu i/ili širenjem na različite domaćine. U svim našim izolatima utvrđena je prisutnost gena *pilA* iz klastera gena *pilABCD*. Ovaj klaster gena kodira proteine za pilus tip IV, koji se nalazi na površini raznih Gram-negativnih bakterija i pokazalo se da su važni čimbenici kolonizacije domaćina. Istraživanja Paranjpye i Strom (2005) su pokazala da je inaktivacija *pilA* smanjila sposobnost bakterije *V. vulnificus* da formira biofilm i značajno smanjila prianjanje na ljudske epitelne stanice (HEp-2) i virulenciju na mišjem modelu. Osim toga, utvrđeno je da *pilA* doprinosi postojanosti bakterije *V. vulnificus* u kamenicama (Paranjpye i sur., 2007). Analiza formiranja biofilma potvrdila je da izolati koji posjeduju gen *pilA* imaju svojstvo značajne tvorbe biofilma. Odsutnost *pilA* gena stoga bi mogla značajno smanjiti prianjanje za domaćina i rezultirati niskom stopom infekcije. Geni MSHA klastera su prisutni u većini ispitanih izolata u ovom istraživanju, a kodiraju hemaglutinin osjetljiv na manozu (MSHA) te tako utječu na funkcionalnost MSHA tipa IV pilusa (Fu i sur., 2021) bitnog za adheziju i kolonizaciju (Bomchil i sur., 2003). Geni *hutA* i *hutR* prisutni su u većine pretraživanih izolata, a kodiraju hem receptore koji su bitni za iskorištavanje željeza u životnom ciklusu bakterije (Ratledge i Dover, 2003; Fu i sur., 2021). Utvrđen je gen *wbfV/wcvB* koji kodira kapsularni polisaharid kod svih pretraživanih izolata. Kod bakterije *V. parahaemolyticus* je

utvrđeno da prozirnost kolonije korelira s povećanom proizvodnjom kapsularnog polisaharida (CPS) (Enos-Berlage i sur., 2000). Fu i sur. (2021) su testom pokretljivosti potvrdili da izolati s delecijom *hutR* imaju značajno nižu sposobnost pokretanja, što upućuje da njihova prisutnost može pridonijeti utvrđivanju patogenosti izolata *V. harveyi*. Daljnja genomska analiza pokazala je da je sustav izlučivanja sličan među izolatima *V. harveyi* te je uočena velika sličnost sa sadržajem T3SS1 gena kod bakterije *V. parahaemolyticus*. Fu i sur. (2021) su uočili da su geni T3SS1 konzerviranih među genomima 80% izoliranih *V. harveyi* uključenih u njihovo istraživanje te da su sadržaj i struktura gena T3SS1 kod *V. harveyi* i *V. parahaemolyticus* vrlo slični i očuvani. Geni *vctC*, *vctD*, *vctG* i *vctP* koji kodiraju receptore za vezivanje željeza (Payne i sur., 2015) su prisutni u svim pretraživanim izolatima. Poznato je da je vezivanje željeza iz tkiva domaćina važan čimbenik kolonizacije tkiva (Ratledge i Dover, 2003). Svi naši istraživani izolati osim jednog imaju gen *CqsA*. To je gen koji kod bakterija iz roda *Vibrio* kodira receptor za autoinduktor CAI-1 važan za međustaničnu komunikaciju (Ng i sur., 2011). Svi pretraživani izolati imaju gene *epsC*, *epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsH*, *epsI*, *epsJ*, *epsK*, *epsL*, *epsM*, *epsN* i *gpsD* koji kodiraju sintezu egzopolisaharida koji su važni u interakciji bakterija i njihovog okoliša i kemijski su raznoliki (Bramhachari i Dubey, 2006). Gen *hcp-1* je utvrđen kod jednog pretraživanog izolata, a gen *vgrG* kod četiri, a oba su važna za međustaničnu komunikaciju. Međustanična komunikacija je proces koji omogućuje bakterijama da komuniciraju pomoću signalnih molekula zvanih autoinduktori (Nealson i Hastings, 1979; Miller i Bassler, 2001). Ovaj proces omogućuje bakterijama da zajedno reguliraju ekspresiju gena, a time i ponašanje. U svim pretraživanim izolatima bio je prisutan gen *rtxD*, što se podudara s istraživanjem koje su proveli Parvathi i sur. (2011). Geni *rtx* uzrokuju zaokruživanje stanica i depolimerizaciju aktinskog citoskeleta (Boardman i sur., 2007). Nakon analize prisutnih gena virulencije utvrđeno je da neki od pretraživanih izolata imaju gene *sitA* (4/16), *sitB* (3/16), *sitC* (4/16) i *sitD* (3/16) koji su važni za transport željeza i *ast* gen (10/16) koji kodira toplinski stabilan citotoksični enterotoksin. Ovi geni nisu prisutni u drugim bakterijama roda *Vibrio* u pretraživanoj bazi podataka VFBD, a mogli bi predstavljati atipične gene virulencije. *Ast* gen ima važnu ulogu kao citotoksični enterotoksin kod bakterija roda *Aeromonas* te može izazvati enteritis (Rasmussen-Ivey i sur., 2016). Poznato je da se kod infekcije bakterijom *V. harveyi* često javlja enteritis (Liu i sur., 2003) što može biti povezano s ovim genom, iako trenutno nema dovoljno istraživanja koja bi to potvrdila.

Nerazborita upotreba antibiotika, nutritivno opterećenje akvatorija prekomjernim hranjenjem, zagađenje biocidima i teškim metalima, te visoke temperature uslijed globalnog zatopljenja mogu utjecati na aktivnost bakterijskih enzima, na replikaciju plazmida, promijeniti aktivnost faga i spriječiti imunološki sustav da regulira rezistenciju i patogenost bakterija (Tamang i sur., 2017). Intenzifikacijom akvakulture porasla je i primjena antibiotika u akvakulturi sa ciljem kontrole bakterijskih bolesti, te je došlo do razvoja antimikrobne rezistencije (AMR) kod bakterijskih uzročnika bolesti riba (FAO, 2005). Bakterije rezistentne na antimikrobne tvari mogu razviti okolišni rezervoar gena rezistentnih na antibiotike. Sustavi akvakulture stigmatiziraju se kao „žarišta gena antimikrobne rezistencije” i stoga je procjena gena antimikrobne rezistencije u akvakulturi važna tema istraživanja u cijelom svijetu (Watts i sur., 2017).

Pretpostavlja se da bi se patogene bakterije rezistentne na antimikrobne tvari koje se koriste u uzgoju mogle prenijeti na slobodno živuće ribe te posljedično ugroziti ljudsko zdravlje jer divlja riba ne podliježe kontroli prije stavljanja u promet (Cizek i sur., 2010). Budući da se dio antimikrobnih sredstava koja se koriste u akvakulturi koristi i u humanoj medicini treba biti oprezan s njihovom primjenom.

Nakon analize sklopljenih genoma 16 izolata bakterije *V. harveyi* utvrđena je prisutnost pet gena rezistencije: *CRP*, *adeF*, *E. coli parE*, *APH(3'')Ib* i *tet(D)*. Utvrđeni gen *CRP* važan za rezistenciju na makrolide, florkinolone i peniciline uspoređen je s rezultatima dobivenim disk difuzijom i određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije za antibiotike enrofloksacin, florfenikol i ampicilin. Zabilježeno je da svi pretraživani izolati imaju gen *CRP* ali da su osjetljivi na enrofloksacin i florfenikol, međutim svi su rezistentni na ampicilin što je najvjerojatnije posljedica urođene rezistentnosti koja je već prije opisana (Chiou i sur., 2015; Costa i sur., 2021). Gen *adeF* je bitan za razvoj rezistencije na florkinolone i tetracikline. Nakon analize rezultata utvrđeno je da trinaest izolata ima *adeF* gen, a pokazuju osjetljivost na florfenikol i oksitetraciklin testom disk difuzije i mikrodilucije. Nadalje, jedanaest izolata ima utvrđen gen *parE*, međutim rezultati testiranja metodom disk difuzije i mikrodilucije pokazuju osjetljivost tih izolata na florfenikol i oksitetraciklin. Gen *APH(3'')Ib* odgovoran za rezistenciju na aminoglikozide je prisutan kod jednog izolata, ali svi izolati pokazuju testovima disk difuzije i mikrodilucije osjetljivost prema gentamicinu. *Tet(D)* gen važan za rezistenciju na tetracikline je utvrđen kod samo jednog izolata, koji pokazuje smanjenu osjetljivost na oksitetraciklin. Geni virulencije i geni antimikrobne rezistencije se mogu prenositi vertikalno i širiti horizontalnim

prijenosom gena (engl. *Horizontal Gene Transfer*, HGT) te putem mobilnih genetskih elemenata (engl. *Mobile Genetic Elements*, MGE) kao što su plazmidi, bakteriofagi, transpozoni, integrativni i konjugacijski elementi i genetski otoci (Sobecky i Hazen, 2009). Amalina i sur. (2019) su utvrdili da su tijekom procesa manipuliranja, bakterije iz roda *Vibrio* spp. izgubile plazmid, ali su ostale rezistentne na ampicilin, penicilin G, bacitracin i vankomicin, dok je nekoliko izolata ostalo rezistentno na eritromicin, streptomycin i tetraciklin. Rezultati spomenutih istraživanja su pokazali da osjetljivosti na antibiotike kod nekih bakterija *Vibrio* spp. može biti posljedica kromosomskog i plazmidnog prijenosa, što može objasniti zbog čega su neki izolati u ovom istraživanju pokazali osjetljivost u *in vitro* testovima, a imaju prisutnost gena rezistencije za određeni antibiotik.

Analiza svih naprijed opisanih podataka dovodi do zaključaka da biokemijska svojstva, pripadnost pojedinim serotipovima te prisutnost gena virulencije i antimikrobne rezistencije nisu uvjetovani niti povezani s različitim geografskim porijeklom izolata unutar Sredozemlja. Razlog tome može biti to što je Sredozemno more poluzatvoreni bazen (Rodellas i sur., 2015), te postoji velika tržišna razmjena različitih dobnih kategorija lubina i komarče unutar Sredozemlja. Naime, zemlje EU Italija, Grčka, Francuska, Španjolska i zemlje sjeverne Europe su uz Tursku i Tunis važni proizvođači mlađa i konzumne ribe. Također su vrlo važne trgovinske veze Grčke s drugim zemljama EU i s druge strane sredozemnim zemeljama izvan EU, koje su glavni proizvođači lubina i komarče, ali koje veliki udio mlađa za uzgoj uvoze iz zemalja EU (Aguilera i sur., 2019). Navedene činjenice predstavljaju realnu opasnost od širenja bakterija koje onda više nisu svojstvene za određeno područje te nemaju tipične karakteristike vezane za određeno geografsko područje.

6. ZAKLJUČCI

1. Pretraživani izolati s područja Sredozemlja su veoma homogeni u svojim morfološkim i biokemijskim osobitostima bez obzira na geografsku pripadnost.
2. U pretraživanim izolatima zastupljeni su serotipovi A, B i C, ali 38% pretraživanih izolata ne pripada nijednom serotipu i nemoguće je korelirati serotip s virulencijom pojedinog izolata. S obzirom da su istraživanja serotipova *V. harveyi* vrlo oskudna potrebna su daljnja, mnogo opsežnija serološka istraživanja s ciljem utvrđivanja eventualnih različitosti između pojedinih serotipova.
3. Nakon sklapanja genoma 16 izolata utvrđena je prisutnost sličnog sastava gena virulencije kod svih izolata bez obzira na geografsku pripadnost.
4. Utvrđeno je da neki izolati pokazuju osjetljivost na gentamicin, florfenikol i oksitetraciklin *in vitro* testovima disk difuzije i mikrodilucije, iako u svom genomu sadrže gene antimikrobne rezistencije za spomenute antimikrobne tvari. Utvrđene činjenice upućuju na mogućnost prijenosa gena antimikrobne rezistencije plazmidima koje bakterija tijekom subkultivacije može otpustiti.
5. Nije utvrđena korelacija geografskog porijekla niti pripadnosti određenom serotipu s prisutnošću utvrđenih gena virulencije i antimikrobne rezistencije. Većina izolata podvrgnutih cjelogenomskom sekvenciranju ima sličan sastav gena odgovornih za virulenciju i utvrđeno je prisustvo gena odgovornih za uočene patološke promjene kod oboljelih riba kao što su krvarenja ili izraziti enteritis.
6. Homogenost izolata različitog geografskog porijekla je očekivana i može biti uzrokovana činjenicom da je Sredozemno more relativno zatvoreno, ali može ukazivati i na činjenicu da na tom području postoji velika trgovinska razmjena svih kategorija lubina i komarče.
7. S obzirom na dobivene rezultate uz nezamjenjivu primjenu dobre proizvođačke prakse kao i mjera biosigurnosti vidljivo je da je moguće izraditi regionalne smjernice prevencije i kontrole bolesti. Ukoliko se pojave znakovi bolesti ribu treba tretirati antibakterijskim tvarima da bi se spriječili visoki mortaliteti. Kako je u ovom istraživanju utvrđena osjetljivost na enrofloksacin, florfenikol, oksitetraciklin i sulfametoksazol/trimetoprim ova antimikrobna sredstva mogu uz odgovornu i razboritu primjenu biti dobar izbor za liječenje.

8. Analiza gena virulencije upućuje na mogućnost razvoja jedinstvenog cjepiva za područje Sredozemlja. S obzirom da komercijalno cjepivo protiv bakterije *V. harveyi* nije razvijeno nego se uglavnom koriste autogena cjepiva proizvedena inaktivacijom bakterija u budućnosti treba razmatrati opcije razvoja novih generacija cjepiva koja će se temeljiti na tehnologiji rekombinantnih cjepiva.

7. LITERATURA

1. Abu-Zeid M.A. i El-Shibini F.Z. (1997): Egypt's high aswan dam. *Wat. Res. Dev.* 13, 209–217.
2. Aguilera C., Furones D., Reverté C., Sanjuan-Vilaplana C.A., Basurco B., López-Francos A., Llorente I. i Ramos S. (2019): Integrated Holistic Assessment of Mediterranean Aquaculture. Deliverable 1.3 of the Horizon 2020 project MedAID. Dostupno na: <http://www.medaid-h2020.eu/index.php/deliverables/> (pistupljeno 03.05.2022.).
3. Alcock B.P., Raphenya A.R., Lau T.T.Y., Tsang K.K., Bouchard M., Edalatmand A., Huynh W., Nguyen A.V., Cheng A.A., Liu S., Min S.Y., Miroshnichenko A., Tran H.K., Werfalli R.E., Nasir J.A., Oloni M., Speicher D.J., Florescu A., Singh B., Faltyn M., Hernandez-Koutoucheva A., Sharma A.N., Bordeleau E., Pawlowski A.C., Zubyk H.L., Dooley D., Griffiths E., Maguire F., Winsor G.L., Beiko R.G., Brinkman F.S.L., Hsiao W.W.L., Domselaar G.V., McArthur A.G. (2020): CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 48(D1), D517-D525.
4. Alvarez J.D., Austin B., Alvarez A.M. i Reyes H. (1998): *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *J. Fish Dis.* 21, 313-316.
5. Amalina N.Z., Santha S., Zulperi D., Amal M., Yusof M.T., Zamri-Saad M. i Ina-Salwany M.Y. (2019): Prevalence, antimicrobial susceptibility and plasmid profiling of *Vibrio* spp. isolated from cultured groupers in Peninsular Malaysia. *BMC Microbiology.* 19(1), 251.
6. Amaro C., Fouz B., Sanjuan E. i Romalde J.L. (2020): *Vibriosis. U: Climate Change and Infectious Fish Diseases* (ur. Woo P.T.K., Leong J.L. i Buchmann K.). CABI Publishing, England. 182–210.
7. Austin B. i Austin D.A. (2012): *Bacterial Fish Pathogens. U: Diseases of Farmed and Wild Fish.* 5th edn. Springer-Praxis Publishing, Chichester. 171-172, 141-142.
8. Austin B. i Zhang X.H. (2006): *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 119–124.

9. Bai F., Pang L., Qi Z., Chen J., Austin B. i Zhang X.H. (2008): Distribution of five vibrio virulence-related genes among *Vibrio harveyi* isolates. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54, 71–78.
10. Baliga P., Shekar M. i Venugopal M.N. (2018): Potential Outer Membrane Protein Candidates for Vaccine Development Against the Pathogen *Vibrio anguillarum*: A Reverse Vaccinology Based Identification. *Curr. Microbiol.* 75, 368–377.
11. Barnett M.E. (1989): Selective and differential media. U: Microbiology Laboratory Exercise (ur. Jaffe G.F.). C. Brown Publishers, College Division, Iowa. 49-56.
12. Baron S., Smith P. i Verner-Jeffreys D.W. (2020): Setting epidemiological cut-off values for bacteria isolated from aquatic animals: a toolbox for designing a 96-well plate for microdilution MIC assays. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 40(2), 55-61.
13. Bauer J., Teitge F., Neffe L., Adamek M., Jung A., Peppler C., Steinhagen D. i Jung-Schroers V. (2020): Impact of a reduced water salinity on the composition of *Vibrio* spp. in recirculating aquaculture systems for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its possible risks for shrimp health and food safety. *J. Fish Dis.* 44(1), 89-105.
14. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. i Turck M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4), 493-496.
15. Baumann P., Baumann S., Bang S. i Woolkalis M.J. (1981): Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *beneckeae*, and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Beneckeae*. *Curr. Microbiol.* 4, 127-132.
16. Bellos G., Angelidis P. i Miliou H. (2015): Effect of temperature and seasonality principal epizootiological risk factor on vibriosis and photobacteriosis outbreaks for European sea bass in Greece (1998-2013). *J. Aquac. Res. Dev.* 6, 338.
17. Bethoux J.P. (1979): Budgets of the Mediterranean Sea. Their dependence on the local climate and on the characteristics of the Atlantic waters. *Oceanol. Acta.* 2, 157–163.
18. Bethoux J.P. i Gentili B. (1998): Functioning of the Mediterranean Sea: past and present changes related to freshwater input and climate change. *J. Mar. Syst.* 557, 1–15.
19. Bethoux J.P., Gentili B., Morin P., Nicolas E., Pierre C. i Ruiz-Pino D. (1999): The Mediterranean Sea: a miniature ocean for climatic and environmental studies and a key for the climatic functioning of the North Atlantic. *Prog. Oceanogr.* 44, 131–146.

20. Boardman B.K., Meehan B.M. i Fullner Satchell K.J. (2007): Growth phase regulation of *Vibrio cholerae* RTX toxin export. *J. Bacteriol.* 189(5), 1827-1835.
21. Bomchil N., Watnick P., Kolter R. (2003): Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 185, 1384–1390.
22. Bondad-Reantaso M. i Subasinghe R. (2000): Aquaculture development, health and wealth. U: Proceedings of the Aquaculture in the Third Millennium (ur. Subasinghe, R.P.). NACA, Bangkok i FAO, Rome. 167-197.
23. Bramhachari P.V. i Dubey S.K. (2006): Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(5), 571-577.
24. Buller N.B. (2014): Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. 2nd edn. CABI Publishing, England.
25. Cano-Gomez A., Bourne D.G., Hall M.R., Owens L. i Høj L. (2009): Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: current methods and future prospects. *Aquaculture.* 287(1), 1–10.
26. Carvalho N. i Guillen J. (2021): Aquaculture in the Mediterranean, EMed. Mediterranean Yearbook 2021. European Institute of the Mediterranean, Barcelona. 276-281.
27. Cascarano M.C., Stavrakidis-Zachou O., Mladineo I., Thompson K.D., Papandroulakis N. i Katharios P. (2021): Mediterranean Aquaculture in a Changing Climate: Temperature Effects on Pathogens and Diseases of Three Farmed Fish Species. *Pathogens.* 10(9), 1205.
28. Chatterjee S. i Haldar S. (2012): *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* 1, 1–7.
29. Chen L., Yang J., Yu J., Yao Z., Sun L., Shen Y. i Jin Q. (2005): VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic. Acids. Res.* 33, D325–D328.
30. Chen X., Wu S., Shi C. i Li N. (2004): Isolation and identification of pathogenetic *Vibrio harveyi* from estuary cod *Epinephelus coioides*. *J. Fish. Sci. China.* 11, 313-317.
31. Chiou J., Li R. i Chen S. (2015): CARB-17 family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59(6), 3593-3595.

32. Cizek A., Dolejska M., Sochorova R., Strachotova K., Piackova V. i Vesely T. (2010): Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Microbiol.* 142, 435–439.
33. CLSI (2021): M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Supplement. 31th edn. Wayne, PA.
34. CLSI (2020a): VET03 Methods for Antimicrobial Broth Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals. CLSI document. 2nd edn. Wayne, PA.
35. CLSI (2020b) VET04 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals. CLSI document. 3th edn. Wayne, PA.
36. Compassion in World Farming (2021): Gilthead seabream (*Sparus aurata*) statistics summary. Dostupno na: <https://www.compassioninfoodbusiness.com/media/7447728/gilthead-seabream-in-numbers.pdf> (pristupljeno 10.02.2022.).
37. Costa W.F., Giambiagi-deMarval M. i Laport M.S. (2021): Antibiotic and Heavy Metal Susceptibility of Non-Cholera *Vibrio* Isolated from Marine Sponges and Sea Urchins: Could They Pose a Potential Risk to Public Health? *Antibiotics.* 10(12), 1561.
38. Crawford J.A., Kaper J.B. i DiRita V.J. (1998): Analysis of ToxR-dependent transcription activation of ompU, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 29, 235–246.
39. Cui J., Fan X.T., Liu W.Z., Li H.Y., Zhou Y.C., Wang S.F. i Xie Z.Y. (2014): Isolation and identification of vibriosis pathogens of marine culture fishes in Southern China. *J. Hunan. Univ. Nat. Sci.* 32, 245–251.
40. Davison H.C., Woolhouse M.E.J. i Low J.C. (2000): What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends. Microbiol.* 8(12), 554–559.
41. Diana J.S. (2009): Aquaculture Production and Biodiversity Conservation. *Bioscience.* 59(1), 27–38.
42. Dong H.T., Taengphu S., Sangsuriya P., Charoensapsri W., Phiwsaiya K., Sornwatana T., Khunrae P., Rattanarojpong T. i Senapin S. (2017): Recovery of *Vibrio harveyi* from

- scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam. *Aquaculture*. 473, 89–96.
43. Elmahdi S., DaSilva L.V. i Parveen S. (2016): Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. *Food. Microbiol.* 57, 128–134.
 44. Enos-Berlage J.L. i McCarter L.L. (2000): Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 182(19), 5513-5520.
 45. FAO (2018): FishStatJ. Cultured Aquatic Species Information Programme. U: FAO Fisheries and Aquaculture Department. FAO, Rome. Dostupno na: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en> (pristupljeno 11.05.2022.).
 46. FAO (2008): The state of world fisheries and aquaculture. Rome, Italy. Dostupno na: http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/akvakultura/CulturedSpecies/file/en/en_gilt_headseabr.htm (pristupljeno 23.01.2022.).
 47. FAO (2006): Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health. Seoul, Republic of Korea. Dostupno na: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/133869/9241595124_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y (pristupljeno: 14.02.2022.).
 48. FAO (2005): Responsible use of antibiotics in Aquaculture. FAO, Rome. Dostupno na: <http://www.fao.org/3/a-a0282e.pdf> (pristupljeno 12.05.2022.).
 49. Farid A.F. i Larsen J.L. (1981): Growth of *Vibrio alginolyticus*: Interacting effects on pH, temperature, salt concentration, and incubation time. *Zbl. Bact. Mik. Hyg.* 2(1), 68-75.
 50. Farmer D.M. i Armi L. (1988): The flow of Atlantic water through the strait of gibraltar. *Prog. Oceanogr.* 21, 1-105.
 51. FEAP (2020): European Aquaculture Production Report 2014–2019. FEAP, Brussels, Belgium. Dostupno na: https://feap.info/wp-content/uploads/2020/10/20201007_feap-production-report-2020.pdf (pristupljeno 02.02.2022.).
 52. Federation of Greek Mariculture (2019): Aquaculture in Greece; Annual Report. Federation of Greek Mariculture, Athens, Greece. Dostupno na:

https://fgm.com.gr/uploads/file/FGM_19_ENG_WEB_spreads.pdf (pristupljeno 04.02.2022.).

53. Firmino J., Furones M.D., Andree K.B., Sarasquete C., Ortiz-Delgado J.B., Asencio-Alcudia G., i Gisbert E. (2019): Contrasting outcomes of *Vibrio harveyi* pathogenicity in gilthead seabream, *Sparus aurata* and European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*. 511, 734210.
54. Fouz B., Llorens A., Liz D., Isern Subich M. i Amaro C. (2017): Emergence of a new serovar of *Vibrio harveyi* pathogenic for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). U: 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (ur. Mladineo I.). European Association of Fish Pathologists, Belfast. 430.
55. Fouz B. i Amaro C. (2003): Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms. *Aquaculture*. 217, 677–682.
56. Frank J.A., Reich C.I., Sharma S., Weisbaum J.S., Wilson B.A. i Olsen G.J. (2008): Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(8), 2461-70.
57. Fu S., Ni P., Yang Q., Hu H., Wang Q., Ye S. i Liu Y. (2021): Delineating the key virulence factors and intraspecies divergence of *Vibrio harveyi* via whole-genome sequencing. *Can. J. Microbiol.* 67(3), 231-248.
58. Gao P., Mao D., Luo Y., Wang L., Xu B. i Xu L. (2012): Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistant genes in aquaculture environment. *Water. Res.* 46, 2355–2364.
59. Gogarten J.P., Doolittle W.F. i Lawrence J.G. (2002): Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2226– 2238.
60. Gomez-Gil B., Soto-Rodàiguez S., García-Gasca A., Roque A., Vazquez-Juarez R. i Thompson F.L. (2004): Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*. 150, 1769–1777.
61. Guérin-Faubleé V., Rosso L., Vigneulle M. i Flandrois J.P. (1995): The effect of incubation temperature and sodium chloride concentration on the growth kinetics of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum*-related organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 621–629.

62. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N. i Tesler G. (2013): QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinform.* 29(8), 1072-1075.
63. Hacker J., Hentschel U. i Dobrindt U. (2003): Prokaryotic chromosomes and disease. *Science.* 301, 790– 793.
64. Haenen O.L.M., Fouz Rodríguez B., Amaro González C., Isern M.M., Mikkelsen H., Zrnčić S., Travers M.A., Renault T., Hellstrom A. i Dalsgaard I. (2014): Vibriosis in aquaculture. 16th EAFP Conference. *B. Eur. Assoc. Fish Pat.* 34 (4), 138–147.
65. Haffray P., Tsigenopoulos C.S., Bonhome F., Chatain B., Magoulas A. (2007): European sea bass – *Dicentrarchus labrax*. U: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations (ur. Svåsand T., Crosetti D., García-Vázquez E., Verspoor E.). *Genimpact final scientific report.* 40–46.
66. Haldar S., Maharajan A., Chatterjee S., Hunter S.A. i Chowdhury N. (2010): Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiol. Res.* 165, 639–648.
67. Hendrie M.S., Hodgkiss W. i Shewan J.M. (1970): The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64, 151-169.
68. Hernandez G. i Olmos J. (2004): Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 722–727.
69. Heuer O.E., Kruse H., Grave K., Collignon P., Karunasagar I. i Angulo F.J. (2009): Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1248–1253.
70. Hundenborn J., Thurig S., Kommerell M., Haag H. i Nolte O. (2013): Severe wound infection with *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: a case report and review of the literature. *Case Rep. Med.* 2013, 610-632.
71. Inglis V., Roberts R.J. i Bromage N.R. (1993): *Bacterial diseases of fish.* Oxford, Blackwell Scientific Publications, England.

72. Jiravanichpaisal P., Miyazaki T. i Limsuwan C. (1994): Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health. 6, 27-35.
73. Johnson F.H. i Shunk I.V. (1936): An interesting new species of luminous bacteria. J. Bacteriol. 31(6), 585-593.
74. Kalatzis P., Castillo G.D., Katharios P. i Middelboe M. (2018): Bacteriophage Interactions with Marine Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy. Antibiotics. 7, 15.
75. Kalatzis P.G., Bastias R., Kokkari C. i Katharios P. (2016): Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. PLoS One. 11, e0151101.
76. Kang C.H., Kim Y., Oh S.J., Mok J.S., Cho M.H. i So J.S. (2014): Antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* isolated from seawater in Korea. Mar. Pollut. Bull. 86, 261–265.
77. Karst S.M., Albertsen M., Kirkegaard R.H., Dueholm M.S. i Nielsen P.H. (2016): Molecular methods. U: Experimental Methods in Wastewater Treatment (ur. Daims H.). IWA Publishing, London. 285-317.
78. Karunasagar I., Pai R. i Malathu G.R. (1994): Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture. 128, 203-209.
79. Khouadja S., Lamari F. i Bakhrouf A. (2013): Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during disease outbreaks. Int. Aquat. Res. 5(1), 13.
80. Kim M.N. i Bang H.J. (2008): Detection of marine pathogenic bacterial *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction (PCR). J. Environ. Biol. 29, 543–546.
81. Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S. i Nishibuchi M. (1999): Identification of *Vibrio parahaemolyticus* at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. J. Clin. Microbiol. 37, 1173– 1177.
82. Kolmogorov M., Bickhart D.M., Behsaz B., Gurevich A., Rayko M., Shin S.B., Kuhn K., Yuan J., Pevnikov E., Smith T.P.L. i Pevzner P.A. (2020): metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. Nat. Methods. 17, 1103–1110.

83. Krupesha–Sharma S.R., Pradeep M.A., Sadu N., Dube P.N. i Vijayan K.K. (2017): First report of isolation and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from cage–farmed cobia (*Rachycentron canadum*). J. Fish Dis. 40, 953–958.
84. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. i Tamura K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 35(6), 1547-1549.
85. Kumar P., Thirunavukkarasu A.R., Subburaj R. i Thiagarajan G. (2015): Concept of stress and its mitigation in aquaculture. U: Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture (ur. Pachiappan P.). Springer, New Delhi. 96-100.
86. Kundu R., Casey J.P. i Sung W.K. (2019): HyPo: Super Fast & Accurate Polisher for Long Read Genome Assemblies. bioRxiv. 12(19), 882506.
87. Lafferty K.D., Harvell C.D., Conrad J.M., Friedman C.S., Kent M.L., Kuris A.M., Powell E.N., Rondeau D. i Saksida S.M. (2015): Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. Ann. Rev. Mar. Sci. 7(1), 471–496.
88. Lavilla-Pitogo C.R., Leano E.M. i Paner M.G. (1998): Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. Aquaculture. 164, 337–349.
89. Lazado C.C., Caipang C.M., Brinchmann M.F. i Kiron V. (2011): *In vitro* adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. Vet. Microbiol. 148, 252–259.
90. Lejeusne C., Chevaldonné P., Pergent-Martini C., Boudouresque C.F. i Perez T. (2010): Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. Trends. Ecol. Evol. 25, 250–260.
91. Liang X., Chen B., Nie X., Shi Z., Huang X. i Li X. (2013): The distribution and partitioning of common antibiotics in water and sediment of the Pearl River Estuary, South China. Chemosphere. 92, 1410–1416.
92. Lin Z., Kumagai K., Baba K., Mekalanos J.J. i Nishibuchi M. (1993): *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. J. Bacteriol. 175, 3844– 3855.

93. Liu S., Li E., Cai Y., Wang S., Ren Z., Li Q., Guo W., Wu Y. i Zhou Y. (2018): Isolation, identification and pathogenicity characterization of *Vibrio ponticus* from the golden pompano *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*. 496, 285–290.
94. Liu P.C., Chuang K.K i Lee K.K. (2003): Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *J. Appl. Ichthyol.* 19(1), 59-61.
95. Liu P.C., Lee K.K. i Chen S.N. (1996): Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tigerprawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 413-416.
96. Lobanovska M. i Pilla G. (2017): Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future. *J. Biol. Med.* 90(1), 135-145.
97. Loo K.Y, Letchumanan V., Woan-Fei J.L., Pusparajah P., Goh B.H., Ab Mutalib N.S, He Y.W. i Lee L.H. (2020): Incidence of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. *Rev. Aquaculture*. 12(4), 2590–2608.
98. Mahoney J.C., Gerding M.J., Jones S.H. i Whistler C.A. (2010): Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7459-7465.
99. Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y. i Najima M. (2003): Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*. 361, 743– 749.
100. Mancuso M., Genovese M., Guerrera M.C., Casella G., Genovese L., Piccolo G. i Maricchiolo G. (2015): First episode of vibriosis in wild specimens of *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768) in the Mediterranean Sea. *Cah. Biol. Mar.* 56, 355–361.
101. Manfrina A. (2020): *Vibrio anguillarum*. U: Diagnostic manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture (ur. Zrnčić S.). Ciheam, Zaragoza. 67-73.
102. Martin M. (2011): Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 17(1), 10-12.
103. Mary G., Calamari D., Galli P., Castiglioni S., Crosa G. i Fanelli R. (2004): Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*. 54, 661-668.

104. Massa F., Onofri L. i Fezzardi D. (2017): Aquaculture in the Mediterranean and the Black Sea: a blue growth perspective. U: Hanbook on the Economics and Management of Sustainable Oceans (ur. Bunes P.A.L.D., Svennson L.E. i Markadya A.). Edward Elgar Publishing, Cheltenham. 93–122.
105. Miller M.B. i Bassler B.L. (2001): Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165-199.
106. Miller V.L. i Mekalanos J.J. (1984): Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81(11), 3471-3475.
107. Millot C. i Taupier-Letage I. (2005): Circulation of the Mediterranean Sea. *Handbook Env. Chem.* 5(K), 29–66.
108. Mohamad N., Noor A., Mohammad A., Ina Salwany M. Y., Zamri S. M., Nasruddin N. S., Al-saari N., Mino S. i Sawabe T. (2019): Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture.* 512, 734289.
109. Mohi M.M., Kuratani M., Miyazaki T. i Yoshida T. (2010): Histopathological studies on *Vibrio harveyi*-infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck et Schlegel), cultured in Japan. *J. Fish Dis.* 33, 833–840.
110. Muniesa A., Basurco B., Aguilera C., Furones D., Reverte C., Sanjuan-Vilaplana A., Dverdal Jansen M., Brun E. i Tavornapanich S. (2020): Mapping the knowledge of the main diseases affecting sea bass and sea bream in the Mediterranean. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 1089-1100.
111. Nakai T., Sugimoto R., Park K.H., Matsuoka S., Mori K., Nishioka T. i Maruyama K. (1999): Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellow tail. *Dis. Aquat. Organ.* 37, 33-41.
112. Nakayama T., Ito E., Nomura N., Nomura N. i Matsumura M. (2006): Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 258(2), 194-199.
113. Nealson K.H. i Hastings J.W. (1979): Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43, 496-518.
114. Newby D.T., Reed D.W., Petzke L.M., Igoe A.L., Delwiche M.E., Roberto F.F., McKinley J.P., Whiticar M.J. i Colwell F.S. (2004): Diversity of methanotroph communities in a basalt aquifer. *Microbiol. Ecol. J.* 48(3), 333-44.

115. Ng W.L., Perez L.J., Wei Y., Kraml C., Semmelhack M.F. i Bassler B.L. (2011): Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems. *Mol. Microbiol.* 79(6), 1407-1417.
116. Nguyen H.T., Thu Nguyen T.T., Tsai M.A., Ya-Zhen E., Wang P. C. i Chen S.C. (2017): A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish. Shellfish. Immunol.* 65, 118-126.
117. Nishimori E., Hasegawa O., Naumata T. i Wakabayashi H. (1998): *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathol.* 33, 495-502.
118. Oakey H., Levy N., Bourne D., Cullen B. i Thomas A. (2003): The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1293-1303.
119. Ochman H., Lawrence J.G. i Groisman E.A. (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 405, 299– 304.
120. Osoril C.R. i Klose K.E. (2000): A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* 182, 526– 528.
121. Padrós F., Caggiano M., Toffan A., Constenla M., Zarza C. i Ciulli S. (2022): Integrated Management Strategies for Viral Nervous Necrosis (VNN) Disease Control in Marine Fish Farming in the Mediterranean. *Pathogens.* 11(3), 330.
122. Pakingking R., Bautista N.B., Cathedral D., de Jesus-Ayson E.G. (2018): Characterisation of *Vibrio* isolates recovered from the eyes of cage-cultured pompano (*Trachinotus blochii*) infested with caligid parasites (*Lepeophtheirus spinifer*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 38(1), 35-41.
123. Pang L., Zhang X.H., Zhong Y., Chen J., Li Y. i Austin B. (2006): Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(3), 249-55.
124. Papageorgiou N., Kalantzi I. i Karakassis I. (2010): Effects of fish farming on the biological and geochemical properties of muddy and sandy sediments in the Mediterranean Sea. *Mar. Environ. Res.* 69(5), 326-336.
125. Paranjpye R.N., Johnson A.B., Baxter A.E. i Strom M.S. (2007): Role of type IV pilins in persistence of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virginica* oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(15), 5041-5044.

126. Paranjpye R.N. i Strom M.S. (2005): A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect. Immun.* 73(3), 1411-1422.
127. Parvathi A., Mendez D. i Anto C. (2011): Distribution of Putative Virulence Genes and Antimicrobial Drug Resistance in *Vibrio harveyi*. *Indian J. Microbiol.* 51, 332–337.
128. Pascual J., Macián M.C., Arahál D.R., Garay E. i Pujalte M.J. (2010): Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 154–65.
129. Pavia A.T., Bryan J.A., Maher K.L., Hester T.R. i Farmer J.J. (1989): *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Ann. Intern. Med.* 111, 85-86.
130. Pavlinec Ž., Zupičić I.G., Oraić D., Lojkić I., Fouz B. i Zrnčić S. (2022): Biochemical and molecular characterization of three serologically different *Vibrio harveyi* strains isolated from farmed *Dicentrarchus labrax* from the Adriatic Sea. *Sci. Rep.* 12, 7309.
131. Payne S.M., Mey A.R. i Wyckoff E.E. (2015): *Vibrio* Iron Transport: Evolutionary Adaptation to Life in Multiple Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 69-90.
132. Pérez-Ruzafa A. i Marcos C. (2014): Ecology and distribution of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758). U: *Biology of European Sea Bass* (ur. Sánchez Vásquez F.J. i Muñoz-Cueto J.A.). CRC Press, Florida. 3–33.
133. Pesci E.C. i Iglewski B.H. (2003): Quorum sensing. U: *Bacterial Protein Toxins* (ur. Burns D.L., Barbieri J.T., Iglewski B.H. i Rappuoli R.). Wiley Library, Washington. 55-58.
134. Peterson K.M. i Mekalanos J.J. (1988): Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect. Immun.* 56, 2822-2829.
135. Pinto M.F., Baptista T. i Afonso C.C.N. (2017): Development of a new multiplex-PCR tool for the simultaneous detection of the fish pathogens *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* and *Edwardsiella tarda*. *Aquat. Living Resour.* 30, 4.
136. Pizzuto M. i Hirst R.G. (1995): Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. *Dis. Aquat. Organ.* 21, 61-68.

137. Prayitno S.B. i Latchford J.W. (1995): Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*. 132, 105-112.
138. Pretto T. (2018): Vibriosis da *Vibrio harveyi*: studi di eziopatogenesi e di efficacia vaccinale nel branzino (*Dicentrarchus labrax*). Alma Mater Studiorum, Università di Bologna. Dottorska disertacija.
139. Pretto T. (2020): *Vibrio harveyi* group. U: Diagnostic manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture (ur. Zrnčić S.). Ciheam, Zaragoza. 75-82.
140. Pujalte M. J., Sitja-Bobadilla A., Maclan M.C., Belloch C., Alvarez-Pellitero P., Perez-Sanchez J., Uruburu F. i Garay E. (2003): Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 284-292.
141. Qin Y.X, Wang J., Su Q., Wang D.X. i Chen X.Z. (2006): Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. *Acta Oceanol. Sinica*. 25, 154-159.
142. Rameshkumar P., Nazar A.K.A., Pradeep M.A., Kalidas C., Jayakumar R., Tamilmani G., Sakthivel M., Samal A.K., Sirajudeen S., Venkatesan V. i Nazeera B.M. (2017): Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from sea cage cultured cobia (*Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766)). *India. Lett. Appl. Microbiol.* 65, 423–430.
143. Ransangan J. i Mustafa S. (2009): Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass (*Lates calcarifer*) by use of 16S ribosomal DNA sequencing. *J. Aquat. Anim. Health*. 21, 150–155.
144. Rasmussen-Ivey C.R., Figueras M.J., McGarey D. i Liles M.R. (2016): Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Front. Microbiol.* 7, 1337.
145. Ratledge C. i Dover L.G. (2003): Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 54, 881-941.
146. Reichelt J.K. i Baumann P. (1973): Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 94, 283-330.
147. Richardson K. (1991): Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect. Immun.* 59, 2727–2736.

148. Rico R.M., Tapia-Paniagua S., Martinez-Manzanares E., Balebona M.C. i Morinigo M.A. (2008): Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). J. Appl. Microbiol. 105, 752-760.
149. Rigos G., Kogiannou D., Padrós F., Cristòfol C., Florio D., Fioravanti M. i Zarza C. (2021): Best therapeutic practices for the use of antibacterial agents in finfish aquaculture: a particular view on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Mediterranean aquaculture. Rev. Aquacult. 13, 1285-1323.
150. Regulation of the European Parliament and of the Council (2019): Veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. Official Journal of the European Union (EU), 2019/6.
151. Rodellas V., Garcia-Orellana J., Masqué P., Feldman M. i Weinstein Y. (2015): Submarine groundwater discharge as a major source of nutrients to the Mediterranean Sea. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 3926–3930.
152. Ruby E.G. i Morin J.G. (1979): Luminous enteric bacteria of the marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion. Appl. Environ. Microbiol. 38, 406-411.
153. Ruwandeepika H.A.D., Jayaweera T.S.P., Bhowmick P.P., Karunasagar I., Bossier P. i Defoirdt T. (2012): Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. Rev. Aquac. 4, 59–74.
154. Ruwandeepika H.A., Defoirdt T., Bhowmick P.P., Shekar M., Bossier P. i Karunasagar I. (2010): Presence of typical and atypical virulence genes in vibrio isolates belonging to the Harveyi clade. J. Appl. Microbiol. 109(3), 888-99.
155. Sandlund N., Rødseth O.M., Knappskog D.H., Fiksdal I.U. i Bergh Ø. (2010): Comparative susceptibility of turbot, halibut, and cod yolk-sac larvae to challenge with *Vibrio* spp. Dis. Aquat. Org. 89(1), 29–37.
156. Santos L. i Ramos F. (2018): Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. I. J. Antimicrob. Agents. 52, 135–143.
157. Sechi L.A., Dupre I., Deriu A., Fadda G. i Zanetti S. (2000): Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. J. Appl. Microbiol. 88, 475– 481.
158. Seth-Smith H.M.B., Dourala N., Fehr A., Qi W., Katharios P., Ruetten M., Mateos J.M., Nufer L., Weilenmann R. i Ziegler U. (2016): Emerging pathogens of gilthead seabream:

- Characterisation and genomic analysis of novel intracellular β -proteobacteria. *ISME J.* 10, 1791–1803.
159. Sharaf El Din S.H. (1977): Effect of the aswan high dam on the Nile flood and on the estuarine and coastal circulation pattern along the Mediterranean Egyptian coast. *Limnol. Oceanogr.* 22, 194–207.
160. Shen G.M., Shi C.Y., Fan C., Jia D., Wang S.Q., Xie G.S., Li G.Y., Mo Z.L. i Huang J. (2017): Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio harveyi*, the causal agent of skin ulcer disease in juvenile hybrid groupers *Epinephelus fuscoguttatus* \times *Epinephelus lanceolatus*. *J. Fish Dis.* 40, 1351–1362.
161. Shi L., Miyoshi S., Hiura M., Tomochika K., Shimada T. i Shinoda S. (1998): Detection of genes encoding cholerae toxin (CT), zonula occludens toxin (ZOT), accessory cholera enterotoxin (ACE) and heat-stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains. *Microbiol. Immunol.* 42, 823–828.
162. Shinoda S. i Nakagawa T. (2004): Distribution of virulence associated genes in *Vibrio mimicus* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiol. Immunol.* 48, 547–551.
163. Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V. i Zdobnov E.M. (2015): BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinform.* 31(19), 3210–3212.
164. Smith P. (2019): The performance of antimicrobial susceptibility testing programmes relevant to aquaculture and aquaculture products. FAO Fisheries and Aquaculture Circular, Rome.
165. Smith P. i Egan S. (2018): Standard protocols for antimicrobial susceptibility testing of *Vibrionaceae* isolated from aquatic animals. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 38(4), 160-164.
166. Snoussi M., Noumi E., Usai D., Sechi L.A. i Amina Bakhrouf S.Z. (2008): Distribution of some virulence related-properties of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Mediterranean seawater (Bay of Khenis, Tunisia): investigation of eight *Vibrio cholerae* virulence genes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2133–2141.
167. Sobecky P.A. i Hazen T.H. (2009): Horizontal gene transfer and mobile genetic elements in marine systems. *Methods. Mol. Biol.* 532, 435–453.

168. Sørensen U.B. i Larsen J.L. (1986): Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol. 51, 593–597.
169. Stanley D.J. (1993): Nile Delta: recent geological evolution and human impact. U: Pour qui la Méditerranée au 21^o siècle? Le système Littoral Méditerranéen, Colloque Scientifique OKEANOS, Montpellier. 231–234.
170. Stevens D.L., Bisno A.L., Chambers H.F., Dellinger E.P., Goldstein E.J. i Gorbach S.L. (2014): Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. Arch. Clin. Infect. Dis. 59, 10–52.
171. Subramanian S. i Rosamma P. (2013): Salinity a significant environmental factor for *Vibrio harveyi* virulence in *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture Res. 44, 10.
172. Surette M.G., Miller M.B. i Bassler B.L. (1999): Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(4), 1639-1644.
173. Tamang M. D., Sunwoo H. i Jeon B. (2017): Phage-mediated dissemination of virulence factors in pathogenic bacteria facilitated by antibiotic growth promoters in animals: A perspective. Anim. Health Res. Rev. 18, 160–166.
174. Tavornpanich S., Leandro M., Le Breton A., Chérif N., Basurco B., Furones D., Muniesa A., Toffan A., Dalla Pozza M., Franzago E., Zrnčić S., Varvarigos P., Saleh H., Cagirgan H., Dverdal J.M. i Brun E. (2019): Biosecurity and risk of disease introduction and spread in Mediterranean seabass and seabream farms. Mediterranean Aquaculture Integrated Development. Dostupno na: <https://drive.google.com/file/d/1EO3hJbCjiY5IKSvLfVoQoGQhYnxa1HNO/view> (pristupljeno 01.05.2022.)
175. Tendencia E.A. (2002): *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. Aquaculture Res. 33, 455-458.
176. Teo J.W., Suwanto A. i Poh C.L. (2000): Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. Antimicrob. Agents. Chemother. 44(5), 1309-1314.

177. Themptander K. (2005): Detection and characterisation of *Vibrio harveyi* isolates. Dublin Institute of Technology, Dublin. Dostupno na: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:130396/FULLTEXT01.pdf> (pristupljeno 02. 05. 2022.).
178. Thompson F.L., Iida T. i Swings J. (2004): Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol.* 68, 403-431.
179. Travers M.A., Le Bouffant R., Friedman C.S., Buzin F., Cougard B., Huchette S., Koken M., i Paillard C. (2009): Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *J. Cell. Biochem.* 106(1), 152-160.
180. Tu Z., Li H., Zhang X., Sun Y. i Zhou Y. (2017): Complete genome sequence and comparative genomics of the golden pompano (*Trachinotus ovatus*) pathogen, *Vibrio harveyi* strain QT520. *PeerJ.* 5, e4127.
181. Turley C.M. (1999): The changing Mediterranean Sea - a sensitive ecosystem? *Prog. Oceanogr.* 44, 387-400.
182. Urbanczyk H., Ogura Y. i Hayash I.T. (2013): Taxonomic revision of Harveyi clade bacteria (family *Vibrionaceae*) based on analysis of whole genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2742-2751.
183. Valderrama K., Balado M., Rey-Varela D., Rodríguez J., Vila-Sanjurjo A., Jiménez C., Lemos M.L. (2019): Outer membrane protein FrpA, the siderophore piscibactin receptor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, as a subunit vaccine against photobacteriosis in sole (*Solea senegalensis*). *Fish. Shellfish. Immunol.* 94, 723-729.
184. Vaser R. i Šikić M. (2021): Time- and memory-efficient genome assembly with Raven. *Nat. Comput. Sci.* 1, 332–336.
185. Vendramin N., Zrnčić S., Padros F., Oraić D, Le Breton A., Zarza C. i Olesen N.J. (2016): Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes and future challenges. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 36, 38-44.
186. Voet D. i Voet J. G. (2004): *Biochemistry*. 3rd edn. Wiley, New Jersey.
187. Wang Z., Hervey W.J., Kim S., Lin B. i Vora G.J. (2015): Complete Genome Sequence of the Bioluminescent Marine Bacterium *Vibrio harveyi* ATCC 33843. *Genome Announc.* 3(1), e01493-14.

188. Wang X.H. i Leung K.Y. (2000): Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology*. 146, 989-998.
189. Watts J.E.M., Schreier H.J., Lanska L. i Hale M.S. (2017): The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Mari. Drugs*. 15(6), 158.
190. Wick R.R., Schultz M.B., Zobel J. i Holt K.E. (2015): Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* 31(20), 3350-3352.
191. Wilkins S., Millar M., Hemsworth S., Johnson G., Warwick S. i Pizer B. (2008): *Vibrio harveyi* sepsis in a child with cancer. *Pediatr. Blood Cancer*. 50, 891-892.
192. World Health Organization (2004): Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: scientific assessment, Geneva, World Health Organization.
193. Xie Z.Y., Hu C.Q., Chen C., Zhang L.P. i Ren C.H. (2005): Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong China. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 202– 207.
194. Zhang X.Z., Wen W.J., Feng Y.Q., Xie Z.Y. i Zhou Y.C. (2010): Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from proboscis intumescence disease in *Babylonia areolata*. *Mar. Sci.* 34, 7-12.
195. Zhang X.H. i Austin B. (2005): Haemolysins in *Vibrio* species. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1011-1019.
196. Zhang X.H. i Austin B. (2000): Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish Dis.* 23, 93-102.
197. Zhu Z.M., Dong C.F., Weng S.P. i He J.G. (2018): The high prevalence of pathogenic *Vibrio harveyi* with multiple antibiotic resistance in scale drop and muscle necrosis disease of the hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂), in China. *J. Fish Dis.* 41, 589–601.
198. Zorriehzakra M.J. i Banaederakhshan R. (2015): Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(2), 64–72.
199. Zrnčić S., Brnić D., Panzarin V., Abbadi M., Lojkić I., Zupičić I.G. i Oraić D. (2022): Transmission Pathways of the VNN Introduced in Croatian Marine Aquaculture. *Pathogens*. 11(4), 418.

8. SAŽETAK

Uzgoj morske ribe u Sredozemlju kontinuirano raste i trenutno prednjači u odnosu na uzgoj školjkaša. U uzgoju dominantno mjesto zauzimaju lubin (*Dicentrarchus labrax*) i komarča (*Sparus aurata*). U akvakulturi Sredozemlja bakterijske bolesti predstavljaju veliki izazov ekonomičnosti proizvodnje, a najznačajniji bakterijski uzročnici bolesti su bakterije *Vibrio anguillarum* i *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, bakterije *Vibrio harveyi*, *Tenacibaculum maritimum* i *Vibrio alginolyticus*. Bakterije iz porodice *Vibrionaceae* izazivaju sistemsku bakterijsku infekciju koja se naziva vibrioza, javlja se kod divljih i uzgojenih morskih riba te nanosi goleme ekonomske gubitke. Bakterija *V. harveyi* iz porodice *Vibrionaceae* se do nedavno smatrala uvjetnim uzročnikom bolesti, međutim posljednjih godina preuzima ulogu emergentnog patogena u morskoj akvakulturi. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoje li biokemijske i serološke razlike među izolatima bakterije *V. harveyi* iz različitih lokaliteta u Sredozemlju, utvrditi sličnosti i razlike u sastavu gena virulencije te ispitati prisustvo gena antimikrobne rezistencije. Nadalje prisustvo gena antimikrobne rezistencije je uspoređivano s rezultatima određivanja osjetljivosti izolata metodama disk difuzije i mikrodilucije (određivanja minimalne inhibitorne koncentracije). U istraživanja je bilo uključeno ukupno 39 izolata bakterije *V. harveyi* izdvojenih iz lubina i komarči na uzgajalištima na hrvatskoj obali Jadranskog mora, a dio izolata je dobiven od suradničkih institucija iz drugih sredozemnih zemalja, poimenice Italije, Francuske, Španjolske, Tunisa, Cipra i Turske. Istraživanjem su utvrđivane morfološke karakteristike bakterijskih kolonija, izolati su identificirani temeljem određivanja biokemijskih svojstava, primjenom molekularnih metoda, serotipizirani su te je određivana osjetljivost na antimikrobne tvari metodama disk difuzije i mikrodilucije. Osim toga sekvencirani su genomi šesnaest izolata te je provedena bioinformatička analiza u kojoj su detektirani geni virulencije i antimikrobne rezistencije. Utvrđeno je da su istraživani izolati bakterije *V. harveyi* homogeni u svojim morfološkim i biokemijskim svojstvima bez obzira na geografsku pripadnost. Utvrđeno je da pretraživani izolati pripadaju već poznatim serotipovima A, B i C, međutim trećina izolata ne pripada ni jednom od prije poznatih serotipova. Većina pretraživanih izolata imala je zastupljene slične gene virulencije, neki od izolata imali su gene *sitA*, *sitB*, *sitC* i *sitD* koji su važni za transport željeza i *ast* gen koji kodira toplinski stabilan citotoksični enterotoksin. Navedeni geni nisu bili prisutni u drugim bakterija iz roda *Vibrio* u pretraživanoj bazi VFBD. Bioinformatičkom

analizom je utvrđena prisutnost pet gena antimikrobne rezistencije: *CRP*, *adeF*, *E. coli parE*, *APH(3'')Ib* i *tet(D)*. Analiza je pokazala da su neki izolati koji su testovima disk difuzije i mikrodilucije pokazivali osjetljivost na gentamicin, florfenikol i oksitetraciklin u svom genomu imali gene antimikrobne rezistencije za te antibiotike. Ti rezultati mogu upućivati da se geni antimikrobne rezistencije prenose pomoću plazmida koje bakterija tijekom subkultivacije može otpustiti. Analizom dobivenih podataka zaključeno je da nema geografske povezanosti izolata s njihovim biokemijskim svojstvima, pripadnošću pojedinim serotipovima, te s prisutnošću utvrđenih gena virulencije i antimikrobne rezistencije. Uzrok tome može biti to što je Sredozemno more relativno zatvoreno te postoji intenzivna trgovina različitim kategorijama uzgajane ribe. Do sada nema puno objavljenih publikacija vezanih za ovu bakteriju na području Sredozemlja te je ovo prvo ovako opsežno istraživanje biokemijskih i genetskih osobitosti sredozemnih izolata bakterije *V. harveyi*.

9. SUMMARY

Over the past forty years, marine aquaculture in the Mediterranean is continuously increasing. Currently, fish farming takes precedence over shellfish farming. Among farmed marine fish two species, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead seabream (*Sparus aurata*) are prevailing. However, bacterial diseases are causing big economical losses and threaten the profitability of the industry. Besides well-known bacterial diseases from the *Vibrionaceae* family caused by *Vibrio anguillarum* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, currently the most important bacterial pathogens are *Vibrio harveyi*, *Tenacibaculum maritimum*, and *Vibrio alginolyticus*. Generally, bacteria from the family *Vibrionaceae* cause a systemic bacterial infection called vibriosis, which occurs in both wild and farmed marine fish. Member of the *Vibrionaceae* family, bacterium *V. harveyi* was considered an opportunistic pathogen, but in recent years has taken the role of primary pathogen in marine aquaculture. This study aimed to compare the biochemical and serological properties of *V. harveyi* isolates collected in the different sites of the Mediterranean basin, identify similarities and differences in the composition of virulence genes, and examine the presence of antimicrobial resistance genes. Moreover, the presence of antimicrobial resistance genes was compared with the results of antimicrobial susceptibility testing obtained using the disc diffusion and microdilution (minimum inhibitory concentration) methods. In total, 39 isolates of *V. harveyi* isolated from sea bass and sea bream were included in the present research. Isolates originated from farmed fish from the Croatian Adriatic Sea and while other isolates were obtained from collaborating institutions from different parts of the Mediterranean region: Italy, France, Spain, Tunisia, Cyprus, and Turkey. The research encompassed the determination of the morphological characteristics, biochemical identification of isolates, molecular identification, serotyping, and determination of antimicrobial susceptibility using the disc diffusion method and microdilution. In addition, eleven isolates were whole genome sequenced and analysed bioinformatically to identify their general properties and presence of virulence and antimicrobial resistance genes. Isolates of *V. harveyi* were found to be homogeneous in their morphological and biochemical characteristics regardless of geographical origin. The studied isolates belong to already known serotypes: A, B, and C, however, some isolates do not belong to any of the previously known serotypes. Most of the studied isolates have similar virulence genes, some of the isolates have *sitA*, *sitB*, *sitC*, and *sitD* genes which are

important for iron transport and *ast* gene encoding thermally stable cytotoxic enterotoxin. These genes are not present in other bacteria of the genus *Vibrio* in the VFBD database. Bioinformatic analysis revealed the presence of five antimicrobial resistance genes: *CRP*, *adeF*, *E. coli parE*, *APH (3'')Ib*, and *tet(D)*. Some isolates, although possessed antimicrobial resistance genes for gentamicin, florfenicol, and oxytetracycline in their genomes showed sensitivity to the same antimicrobials when tested by disc diffusion and microdilution methods. These results may suggest that antimicrobial resistance genes are transmitted by plasmids that bacteria could release during passages. By analyzing the obtained data, we concluded that the geographical origin of studied isolates is not interconnected with their biochemical characteristics, affiliation to certain serotypes, and the presence of virulence and antimicrobial resistance genes. The reason for the homogeneity of isolated may derive from the fact that the Mediterranean Sea is a relatively closed water body and there is a huge farmed fish trade between different areas. So far, there are not many publications on this bacterium in the Mediterranean area, and to the author's knowledge, this is the first extensive study of the biochemical and genetic characteristics of the Mediterranean isolates of *V. harveyi*.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10.11.1990. godine u Rijeci. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja u Srednjoj školi Mate Blažine u Labinu, smjer opća gimnazija 2009. godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme fakultetskog obrazovanja radila sam kao demonstrator na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju i Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju gdje sam pomagala u izvođenju i organizaciji laboratorijskih vježbi studentima mlađih generacija. Tijekom studiranja nagrađivana sam Dekanovim nagradama za izvrstan uspjeh i Dekanovom nagradom za marljivost i ostvarenje uzornih rezultata u studiranju i znanstvenom radu te sam bila stipendistica Genere d.d.

Nakon završenog studija zaposlila sam se u tvrtki Biognost kao stručni suradnik. 2017. godine sam zaposlena na Hrvatskom veterinarskom institutu u Laboratoriju za patologiju riba, školjkaša i rakova kao asistentica na projektu MedAID (Mediterranean Aquaculture Integrated Development) u sklopu programa Europske unije - Obzor 2020. Od 2018. godine sam doktorandica u sklopu programa „Razvoj karijera mladih istraživača“ koji financira Hrvatska zaklada za znanost te sam upisala poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti, Sveučilišta u Osijeku, Instituta Ruđer Bošković i Sveučilišta u Dubrovniku. Sudjelujem u aktivnostima Interreg projekta „Jačanje inovacija i održivosti u jadranskoj akvakulturi-Adriaquanet“. Također, u sklopu Erasmus+ stipendije za stručnu praksu tijekom doktorskog studija boravila sam dva mjeseca u Institutu za akvakulturu koji je u sklopu Sveučilišta u Stirlingu, Velika Britanija. Pod mentorstvom dr. sc. Seana Monaghana i dr. sc. Andrewa Desboisa istraživala sam virulenciju bakterije *V. harveyi* na modelnom organizmu, larvi voštanog moljca *Galleria mellonella* te korištenjem SDS-PAGE i Western blot metoda analizirala dobivene rezultate. Održala sam pozvano predavanje za studente Michigan State University, SAD u okviru kolegija „Aquatic Animal Medicine clerkship“ u travnju 2021. i 2022. godine. Dobitnica sam nagrade Student Award udruženja European Association of Fish Pathologists za usmeno izlaganje pod nazivom: Evaluation of autologous vaccine against *Vibrio harveyi* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) na konferenciji "International Conference on Diseases of Fish and Shellfish 2021".

Tijekom svog rada sudjelovala sam na radionicama: "Fish parasite diagnosis: Diagnostic approach to parasites of European sea bass and gilthead sea bream", Sveučilište u Udinama,

Italija; „Methods for implementation of surveillance procedures for listed fish diseases“ i „Histopathology in fish and crustacean diseases“ u organizaciji Europskog referentnog laboratorija za bolesti riba i rakova, Lyngby, Danska; “Application of epidemiology in aquatic animal health“, CIHEAM Zaragoza, Španjolska te “Genomics Workshop for Early Career Researchers”, Weymouth, Velika Britanija. Na Fakultetu elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu sam sudjelovala na edukaciji iz obrade bioinformatičkih podataka.

Sudjelovala sam na brojnim domaćim i inozemnim konferencijama na kojima sam održala usmena izlaganja.

Članica sam European Association of Fish Pathologists i Hrvatske veterinarske komore.

Popis publikacija (izvor: CROSB):

Poglavlja u knjigama

1. Zupčić, Ivana Giovanna

Vibriosis caused by *Vibrio harveyi*. // Vaccination Strategies in Adriatic hatcheries and farms /Zrnčić, Snježana ; Galeotti, Marco (ur.). Zagreb: Hrvatski veterinarski institut, 2022. str. 26-29

Znanstveni i pregledni radovi

1. Zupčić, Ivana Giovanna; Pavlinec, Željko; Veić, Tina; Oraić, Dražen; Zrnčić, Snježana. Similarities and differences between vibriosis in European sea bass caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi*. // Veterinarski arhiv, 92 (2022), 4; 509-524 (recenzija, članak, znanstveni)
2. Pavlinec, Željko; Zupčić, Ivana Giovanna; Oraić, Dražen; Lojkić, Ivana; Fouz, Belén; Zrnčić, Snježana. Biochemical and molecular characterization of three serologically different *Vibrio harveyi* strains isolated from farmed *Dicentrarchus labrax* from the Adriatic Sea. // Scientific reports, 12 (2022), 7309, 10 doi:10.1038/s41598-022-10720-z (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
3. Zrnčić, Snježana; Brnić, Dragan; Panzarin, Valentina; Abbadi, Miriam; Lojkić, Ivana; Zupčić, Ivana Giovanna; Oraić, Dražen. Transmission Pathways of the VNN Introduced in

- Croatian Marine Aquaculture. // Pathogens, 11 (2022), 418; 11040418, 15 doi:10.3390/pathogens11040418 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
4. Zrnčić, Snježana; Fioravanti, Marialetizia; Gustinelli, Andrea; Oraić, Dražen; Zupčić, Ivana Giovanna; Pavlinec, Željko; Basurco, Bernardo; Furones, Dolors. Survey on laboratories and consultants working in the diagnostics of European seabass and gilthead seabream diseases: preliminary results. // Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 41 (2021), 2; 81-90. (<https://www.bib.irb.hr/1124792>) (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
 5. Mihaljević, Željko; Pavlinec, Željko; Zupčić, Ivana Giovanna; Oraić, Dražen; Popijač, Aleksandar; Pećar, Osvin; Sršen, Ivan; Benić, Miroslav; Habrun, Boris; Zrnčić, Snježana. Noble Pen Shell (*Pinna nobilis*) Mortalities Along the Eastern Adriatic Coast with A Study of the Spreading Velocity. // Journal of marine science and engineering, 9 (2021), 9; 764, 16 doi:10.3390/jmse9070764 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
 6. Oraić, Dražen; Beck, Relja; Pavlinec, Željko; Zupčić, Ivana Giovanna; Maltar, Ljupka; Miškić, Tihana; Acinger Rogić, Žaklin; Zrnčić, Snježana. *Bonamia exitiosa* in European Flat Oyster (*Ostrea edulis*) on the Croatian Adriatic Coast from 2016 to 2020. // Journal of marine science and engineering, 9 (2021), 9; 929, 11 doi:10.3390/jmse9090929 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
 7. Pavlinec, Željko; Zupčić, Ivana Giovanna; Oraić, Dražen; Petani, Bruna; Mustać, Bosiljka; Mihaljević, Željko; Beck, Relja; Zrnčić, Snježana. Assessment of predominant bacteria in noble pen shell (*Pinna nobilis*) collected in the Eastern Adriatic Sea. // Environmental monitoring and assessment, 192 (2020), 1-10 doi:10.1007/s10661-020-08541-6 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
 8. Zrnčić, Snježana; Oraić, Dražen; Zupčić, Ivana Giovanna; Pavlinec, Željko; Brnić, Dragan; Acinger Rogić, Žaklin; Sućec, Ivica; Steinhagen, Dieter; Adamek, Mikolaj. Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia. // Journal of fish diseases, 43 (2020), 1-13 doi:<https://doi.org/10.1111/jfd.13163> (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
 9. Zupčić, Ivana Giovanna; Pavlinec, Željko; Oraić, Dražen; Zrnčić, Snježana. Emergentna vibrioza mediteranskih riba prouzročena bakterijom *Vibrio harveyi*: pregled dosadašnjih saznanja. // Veterinarska stanica, 50 (2019), 5; 455-463 (domaća recenzija, članak, znanstveni)

Znanstveni radovi u zbornicima skupova

1. Zupičić, Ivana Giovanna; Oraić Dražen; Zrnčić, Snježana; Pavlinec, Željko. Rezultati pokusnog cijepjenja lubina (*Dicentrarchus labrax*) autolognim cjepivom protiv *Tenacibaculum maritimum*. // Zbornik radova Veterinarski dani 2021 / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, 2021. str. 307-311 (predavanje, podatak o recenziji nije dostupan, cjeloviti rad (in extenso), znanstveni)
2. Pleadin, Jelka; Krešić, Greta; Lešić, Tina; Vulić, Ana; Kudumija, Nina; Oraić, Dražen; Zupičić, Ivana Giovanna; Zrnčić, Snježana. Kvaliteta lubina i komarče uzgojenih na području Jadrana. // Zbornik radova znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem Veterinarski dani 2021. Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, 2021. str. 391-400 (predavanje, domaća recenzija, cjeloviti rad (in extenso), znanstveni)
3. Zrnčić, Snježana; Pleadin, Jelka; Oraić, Dražen; Džafić, Natalija; Pavlinec, Željko; Zupičić, Ivana Giovanna. Projekt "AdriAquaNet - jačanje inovacija i održivosti u jadranskoj akvakulturi". // Veterinarski dani 2021 / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, 2021. str. 299-306 (predavanje, podatak o recenziji nije dostupan, cjeloviti rad (in extenso), ostalo)

Sažeci sa skupova

1. Pavlinec, Željko; Vaser, Robert; Zupičić, Ivana Giovanna; Zrnčić, Snježana; Oraić, Dražen; Šikić, Mile. Whole genome comparison of *Vibrio harveyi* strains from the Mediterranean Sea. // EAFP 20th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish / Mladineo, Ivona (ur.). Aberdeen: EAFP, 2021. str. 64-64 (predavanje, sažetak, znanstveni)
2. Zrnčić, Snježana; Oraić, Dražen; Pavlinec, Željko; Zupičić, Ivana, Giovanna; Moesgaard, Iburg, Tine; Madsen, Lone; Cuenca, Argelia; Vendramin, Niccolo. An outbreak of IHN in rainbow trout farmed in seawater in Croatia. // 20th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, EAFP 2021 / Mladineo, Ivona (ur.). Aberdeen: EAFP, 2021. str. 31-31 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
3. Zupičić, Ivana Giovanna; Pavlinec, Željko; Oraić, Dražen; Zrnčić, Snježana. Evaluation of autologous vaccine against *Vibrio harveyi* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). // 20th EAFP conference on the diseases of fish and shellfish, EAFP 2021, Abstract book /

- Mladineo, Ivona (ur.). Aberdeen: EAFP, 2021. str. 110-110 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. Zrnčić, Snježana; Pavlinec, Željko; Zupičić, Ivana Giovanna; Oraić, Dražen; Adamek, Mikolaj. Carp Edema Virus: a new threat for the cyprinids inhabiting open waters. // 19th International Conference on Fish and Shellfish Diseases Porto: EAFP, 2019. str. 377-377. (<https://www.bib.irb.hr/1043852>) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 5. Zupičić, Ivana Giovanna; Pavlinec, Željko; Oraić, Dražen; Žuvić, Luka; Zrnčić, Snježana. Isolation and characterisation of EVEX in glass eels (*Anguilla anguilla*). // 19th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Abstract book / Mladineo, Ivona (ur.). Porto: European Association of Fish Pathologists, 2019. str. 150-150. (<https://www.bib.irb.hr/1043797>) (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 6. Pavlinec, Željko; Zupičić, Ivana Giovanna; Lojkić, Ivana; Fouz, Belen; Oraić, Dražen; Mladineo, Ivona; Jozić, Slaven; Llorens, Amparo; Zrnčić, Snježana. A new serogroup of *Vibrio harveyi* in the Adriatic Sea – comparison of virulent vs non-virulent strains for sea bass. // 19th International conference on Fish and Shellfish diseases. Abstract book / Mladineo, Ivona (ur.). Porto: EAFP, 2019. str. 18-18. (<https://www.bib.irb.hr/1043823>) (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 7. Oraić, Dražen; Beck, Relja; Pavlinec, Željko; Zupičić, Ivana Giovanna; Zrnčić, Snježana. Observation of *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) in European flat oyster (*Ostrea edulis*) at the Croatian coast. // 19th International Conference on Fish and Shellfish Diseases / Mladineo, Ivona (ur.). Porto: EAFP, 2019. str. 505-505. (<https://www.bib.irb.hr/1043858>) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 8. Oraić, Dražen; Mikolaj, Adamek; Brnić, Dragan; Zupičić, Ivana Giovanna; Zrnčić, Snježana. Nalaz Carp edema virusa, uzročnika bolesti CEV u šarana i bolesti spavanja u koi šarana – prijetnja uzgoju šarana u Hrvatskoj.. // 13. Međunarodna konferencija o akvakulture „Suradnja proizvodnje i znanosti – temelj uspješnog održivog razvoja akvakulture“ / Holik, Jugoslav (ur.). Vukovar: Hrvatska gospodarska komora, 2018. str. n/d-n/d (pozvano predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
 9. Zupičić, Ivana Giovanna; Oraić, Dražen; Beck, Relja; Jurković, Darija; Zrnčić, Snježana. Bolesti u uzgoju školjkaša u godinama 2016. i 2017.. // Međunarodna konferencija o akvakulture „Suradnja proizvodnje i znanosti – temelj uspješnog održivog razvoja

akvakulture“ / Holik, Jugoslav (ur.). Vukovar: Hrvatska gospodarska komora, 2018. str. n/d-
n/d (pozvano predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)