

Emergentna vibrioza mediteranskih riba prouzročena bakterijom *Vibrio harveyi*: pregled dosadašnjih saznanja



Ivana Giovanna Zupičić*, Željko Pavlinec, Dražen Oraić i Snježana Zrnčić

Sažetak

Bakterije roda *Vibrio* spp. su najčešći uzročnici bolesti akvatičnih životinja. Pripadaju porodici *Vibrionaceae* u kojoj je jedan od najznačajnijih predstavnika klad *Vibrio harveyi*. *V. harveyi* se uobičajeno nalazi u morskom okolišu i predstavnik je normalne flore akvatičnih životinja. Brojni sojevi su opisani kao uzročnici bolesti morskih rakova i školjkaša. U posljednje vrijeme *V. harveyi* nanosi velike štete u uzgoju mediteranskih vrsta riba, posebice u ljetnim mjesecima. *V. harveyi* je Gram-negativna, halofilna, aerobna ili fakultativno anaerobna, načelno nije zoonotska bakterija, međutim zabilježeni su izdvojeni slučajevi oboljenja ljudi. Neki sojevi su visoko patogeni dok se drugi smatraju uvjetno patogenima. Glavni čimbenici virulencije su bičevi, litički enzimi, kapsula, siderofore, hidrofobni površinski antigeni i sposobnost prianjanja i infekcije epitelnih stanica domaćina. Sposobnost stvaranja biofilma omogućava rezistenciju na antibiotike, a sposobnost bakterija da izvlače željezo iz stanica domaćina je ključna za njihovo preživljavanje. Intracelularni sustav

omogućava međustaničnu komunikaciju bakterija. Klinički znaci su slični drugim bakterijskim infekcijama u riba, a obično započinju letargijom i gubitkom apetita. *V. harveyi* posjeduje urođenu rezistenciju na neke antibiotike. U novije se vrijeme razvija bakteriofagna terapija koja je daje obećavajuće rezultate. Cijepljenje je jedan od najučinkovitijih načina prevencije bolesti i metoda redukcije gubitaka i smanjenja uporabe antibiotika. Dobra proizvođačka praksa koja podrazumijeva optimalne uvjete u uzgojnim jedinicama kao i primjena mjera biosigurnosti su važni u sprječavanju ulaska uzročnika bolesti u farmu i širenja na sve uzgojne jedinice. Sve češće se javljaju infekcije visoko patogenim emergentnim sojevima *Vibrio harveyi*. Uzevši u obzir činjenicu da je *V. harveyi* moguće izdvojiti iz okoliša, morskih organizama i probavnog trakta zdravih jedinki, očito je da postoje različiti sojevi iste bakterijske vrste te je potrebno definirati razlike između apatogenih i patogenih sojeva.

Ključne riječi: *V. harveyi*, bakterije, liječenje, profilaksa

Ivana Giovanna ZUPIČIĆ*, dr. vet. med., asistentica, (e-mail: zupicic@veinst.hr), Željko PAVLINEC, mag. biol. mol., asistent, dr. sc. Dražen ORAIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Snježana ZRNČIĆ, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut Zagreb, Hrvatska

Uvod

Bakterije roda *Vibrio* spp. porodice *Vibrionaceae* su najčešći uzročnici bolesti akvatičnih životinja. Među gospodarski najznačajnijim su predstavnici kolokvijalno nazvanog „klada“ *Harveyi* (engl. *Harveyi* clade) kojem pripada jedanaest vrlo sličnih vrsta: *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. mytili*, *V. natriegens*, *V. azureus*, *V. sagamiensis*, *V. ovensii* i *V. jasicida* (Urbanczyk i sur., 2013.). *V. harveyi* se uobičajeno nalazi u morskom okolišu (Sawabe i sur., 2007.) i u fiziološkoj crijevnoj mikroflori slobodno živućih morskih organizama (Ruby i Morin, 1979., Hernandez i sur., 2004.). Ipak, brojni sojevi su opisani kao uzročnici bolesti morskih riba (Alvarez i sur., 1998., Zhang i Austin, 2000., Pujalte i sur., 2003.), rakova (Karunasagar i sur., 1994., Lavilla-Pitogo i sur., 1998.) i školjkaša (Nishimori i sur., 1998.).

Bakterija *V. harveyi* je prvi puta 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.). Znatno kasnije, 1990-ih, *V. harveyi* je opisan kao uzrok 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 znatni mortaliteti u uzgoju larvalnih stadija tigraste kozice (*Penaeus monodon*) i kuruma kozice (*Penaeus japonicus*) koji su se penjali do 100 % (Liu i sur., 1996. a,b). Austin i Zhang (2006.) definiraju *V. harveyi* kao emergentnog uzročnika bolesti u globalnoj akvakulturi. Opisan je kao sve češći uzročnik bolesti uzgajanih riba u suptropskoj regiji te je opisan u kornje (*Epinephelus awoara*) (Qin i sur.,

2006.), azijskog lubina (*Lates calcarifer*) (Tendencia, 2002.), vrste pompano (*Trachinotus blochii*) (Pakingking i sur., 2018.), 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., Li i Xu, 1998., Zhang i sur., 2010.). *V. harveyi* je teško iskorijeniti, a uporaba antibiotika može rezultirati razvojem antimikrobne rezistencije (Karunasagar i sur., 1994.).

Dominantna je heterotrofna vrsta izdvojena iz morskih školjkaša u toplijem dijelu godine u zapadnom Mediteranu. U Europi, posebice Mediteranu javlja se kao znatan uzročnik bolesti lista (*Solea* sp.) (Rico i sur., 2008.) i lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Pujalte i sur., 2003.). Isti autori potvrđuju da je *V. harveyi* jedna od najučestalijih *Vibrio* vrsta u morskoj vodi i školjkašima zapadnog Mediterana. Njihova istraživanja su pokazala da je prevalencija infekcije *V. harveyi* viša u lubina nego komarče. Infekcije vrstom *V. harveyi* se češće javljaju u toplije vrijeme godine, a u ostatku godine ih gotovo i nema.

Zoonotski potencijal

V. harveyi može, iako rijetko, prouzročiti infekcije u ljudi. Prvi je opisan slučaj djevojke na sjeveroistočnoj obali SAD-a zaražene nakon ugriza morskog psa (Pavia i sur., 1989.), zatim u djeteta oboljelog od karcinoma, koje je oboljelo nakon plivanja u Sredozemnom moru u Francuskoj (Wilkins i sur., 2008.). Nadalje, opisan je i slučaj rane na tibiji njemačkog pacijenta, zadobivene nakon pada s plovila u Australiji, bakterijama *V. harveyi* i *Photobacterium damsela* (Hundenborn i sur., 2013.). Nedavno je izvješteno o infekciji rane na tibiji u odraslog Španjolca zadobivene tijekom

silaska s autobusa u Dominikanskoj Republici. Nakon povratka u Španjolsku zatražio je liječničku pomoć te je iz rane izdvojena i identificirana bakterija *V. harveyi* (Del Gigia-Aguirre i sur., 2017.).

Svojstva bakterije *V. harveyi*

V. harveyi je Gram-negativna, halofilna, aerobna ili fakultativno anaerobna, uvjetno patogena bakterija za akvatične životinje. Njen rast ovisi o hranjivoj podlozi, a dobro raste na svim neselektivnim hranjivim podlogama uz dodatak 1-2 % natrijevog klorida na 25-35 °C, tijekom 24-48 sati. Kolonije su glatke, konveksne i sivo-bijele boje. Na Thiosulphate-citrate-bile salt-sucrose agar (TCBS) kolonije su žute, dok su na CHROMagar *Vibrio*TM dvobojne, ružičaste i bijele (Pretto, 2018.).

Fermentira ugljikohidrate i tvori kiseline, ali ne plinove. Tvori 3-butanediol, reducira nitrate i različite enzime kao što su: katalaza, oksidaza, beta-galaktozidaza i arginin dihidrolaza. Najznačajnija karakteristika ove vrste i princip temeljem kojeg se u laboratorijskoj dijagnostici najlakše može razlikovati od bakterija roda *Aeromonas* je osjetljivost na vibriostat pteridin 0/129, koji inhibira njihovu multiplikaciju.

Mehanizam patogenosti

Neki sojevi *V. harveyi* su visoko patogeni, dok se drugi smatraju uvjetno patogenima. Najpatogeniji sojevi mogu izazvati velike ekonomske štete u akvakulturi (Oakey i sur., 2003.). Brojna istraživanja patogenosti i virulencije ove bakterije dokazuju da oba svojstva ovise o soju bakterije i domaćinu (Zhang i Austin, 2000., Austin i Zhang, 2006., Bai i sur., 2008.). Infekcija se odvija kroz tri stadija: 1. bakterija pomoću kemotaktične pokretljivosti ulazi u tkivo domaćina, 2. u tkivu domaćina bakterija razvija sustav za

izdvajanje željeza iz tkiva domaćina, 3. bakterija oštećuje domaćina tvorbom ekstracelularnih tvari (Themptander, 2005.). Infekcija započinje u crijevu i bakterije krvotokom putuju u druge organe te na taj način prouzroče generaliziranu infekciju i posljedičnu smrt ribe (Thompson i sur., 2004.).

Čimbenici virulencije

Čimbenici virulencije bakterije *V. harveyi* nisu još u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da su glavni čimbenici virulencije bičevi koji omogućavaju njenu pokretljivost, litički enzimi (hemolizini, serinske proteaze, metaloproteaze, cisteinske proteaze, hitinaze, fosfolipaze i lipaze), kapsula, siderofori koji pomažu vezivanje željeza, prisutnost hidrofobnog površinskog antigena, sposobnost prijanjanja i infekcije epitelnih stanica domaćina (Wang i Leung, 2000., Ruwandeeepika i sur., 2012.) kao i sposobnost stvaranja biofilma koja im omogućava rezistenciju na antibiotike i dezinficijense (Karunasagar i sur., 1994.). Sposobnost bakterija je ključna za njihovo preživljavanje da izvlače željezo iz stanica domaćina (Ratledge i Dover, 2003.). Jedan od najznačajnijih koraka u virulenciji je prijanjanje bakterije na površinu stanica domaćina koje je regulirano makromolekulama zvanim 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 važni čimbenici virulencije, a ekspresija adhezina može biti ovisna o okolišnim čimbenicima i o receptorima na stanicama domaćina (Wang i Leung, 2000.).

Gram-negativni štapići komuniciraju putem intracelularnog sustava 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 krucijalne važnosti za određivanje osobina virulencije (Themptander, 2005.).

Pokazalo se da okolišni čimbenici, temperatura i salinitet vode imaju znatnu ulogu u virulenciji (Prayitno i Latchford, 1995., Mahoney i sur., 2010., Subramanian i Rosamma, 2013.).

Epizootiologija

Uzročnici vibrioza su ubikvitarni mikroorganizmi u akvatičnom okolišu. Bakterije su izdvojene iz koralja, riba, mekušaca, morskih cvjetnica, spužava, rakova i zooplanktona (Thompson i sur., 2004.).

Nepoznat je točan put bakterije tijekom infekcije ribe, a sumnja se da u ribu ulazi oralnim putem. Sposobna je prevladati želučanu barijeru, ući u crijeva i izazvati sustavno oboljenje. Izbijanju bolesti prethodi mnogostruko povećanje broja infektivnih čestica što povećava mogućnost širenja zaraze na veći broj jedinki u određenoj uzgojnoj jedinici. (Austin i Zhang, 2006.).

Klinički simptomi

Klinički znaci vibrioza su slični drugim bakterijskim infekcijama u riba. Obično započinju letargijom i

gubitkom apetita. Zaraženi primjerci mogu pokazivati i znakove letargije te plivati nepravilno tvoreći spiralne kretnje (Thompson i sur., 2004.). Kako bolest napreduje, koža gubi pigment, postaje crvena i nekrotična i javljaju se promjene na očima - egzoftalmija (engl. *pop-eye*). Mogu se pojaviti i čirevi na koži koji pucaju i prouzroče opsežne ozljede kože, otvorene rane oko peraja i usta te krvarenja u području anusa. Bolest može zahvatiti cijeli organizam i postati sistemska. Unutarnje promjene uključuju: krvarenja i eksudat u trbušnoj šupljini, gastroenteritis, enteritis, crijevnu nekrozu, anemiju, ascites, fokalnu kongestiju jetre, blijeda područja na jetri, petehijalna krvarenja u mišićima, tekućinu u ribljem mjehuru, krvarenja po unutarnjim organima, hijalinu degeneraciju bubrežnih tubula s oštećenjem glomerula i hemosiderozom slezene (Zhang i Austin, 2000.).

Dijagnostika

Bakterije roda *Vibrio* mogu se lako izdvojiti iz oboljelih akvatičnih životinja. U hranjivu podlogu treba dodati natrijev klorid u koncentraciji jednakoj onoj u morskoj vodi koja je prirodni okoliš *V. harveyi*. Postoje različiti komercijalno pripremljeni mediji s dodatkom 1 % ili 2 % natrijevog klorida. Mediji koji se koriste za diferencijaciju vrsta *Vibrio* su: TCBS agar na kojem sojevi koji



Slika 1a. Krvarenja po tijelu lubina; **Slika 1b.** Promjene na škrgama i unutarnjim organima izazvane bakterijom *V. harveyi*. [Autor fotografija: Dražen Oraić]

fermentiraju glukozu formiraju žute, dok drugi sojevi formiraju zelene kolonije (Thompson i sur., 2004.), ChromAgar na kojem su kolonije bakterija ružičaste i bijele te selektivni medij za *V. harveyi*, Vibrio harveyi agar (VHA) koji može diferencirati *V. harveyi* od ostalih 15 *Vibrio* vrsta (Harris i sur., 1996.). Selektivni čimbenici u hranjivoj podlozi koji to omogućavaju su visoki pH i manjak magnezijevih iona potrebnih za rast većini akvatičnih bakterija; visoka koncentracija natrijevog klorida i temperatura inkubacije od 28 °C. Podloga je obogaćena celobiozom i ornitinom jer *V. harveyi* fermentira celobiozu i ornitin i stvara kolonije karakteristične morfologije. Međutim, ova svojstva mogu varirati među različitim izolatima vrste *V. harveyi* (Themptander, 2005.). Bakterije se mogu identificirati brzim biokemijskim testovima kao što je API 20E (Buller, 2004.).

Sustavi za tipizaciju bakterija mogu detektirati raznolikosti u fenotipskoj i genotipskoj strukturi na temelju kojih se bakterije svrstavaju u određene skupine. Identifikacija sojeva bakterije *V. harveyi* može predstavljati izazov jer bakterije *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus*, *V. rotiferianus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mytili* i *V. natriegens* imaju visoki stupanj genotipske i fenotipske sličnosti (Sawabe i sur., 2007.).

Biokemijskim testovima je teško diferencirati *V. harveyi* od *V. alginolyticus*, međutim pomoću nekoliko biokemijskih pokazatelja moguće ih je razdvojiti (Baumann i sur., 1984.). *V. harveyi* daje negativnu *Voges-Proskauer reakciju* (VP), a ureaza je pozitivna.

Serološke se metode uspješno koriste za identifikaciju *V. harveyi* u hrani i akvatičnom mediju. Od molekularnih metoda najznačajnija je lančana reakcija polimerazom (PCR). Slijedovi 16S rRNK gena, koji se kao molekularni marker rutinski koristi u detekciji i identifikaciji bakterija, su kod roda *Vibrio* vrlo očuvani;

npr. vrste *V. harveyi*, *V. campbellii* i *V. rotiferianus* imaju preko 99 % identične slijedove 16S rRNK gena (Gomez-Gil i sur., 2003.). Za umnažanje 16S rRNK gena kod roda *Vibrio* koriste se parovi početnica VH-1 i VH-2 (Oakey i sur., 2003.) ili VHARF i VHARR (Fukui i Sawabe, 2007.), no niti jednim parom se ne postiže potpuna razlučivost svih vrsta. Uz 16s rRNK, u molekularnoj dijagnostici ove bakterije se danas često koristi i *toxR* gen, čiji su slijedovi također vrlo očuvani između vrsta roda *Vibrio*, ali sadrže i odvojive regije, potencijalno korisne za identifikaciju vrste (Cano-Gomez i sur., 2009.). Kod *V. harveyi* razvijena su dva para početnica za PCR *toxR* gena: par Vh_toxR-F i Vh_toxR-R (Conejero i Hedreyda, 2003.) koji daje lažno negativne rezultate za neke *V. harveyi* sojeve i par *toxRF1* i *toxRR1* (Pang i sur., 2006.) koji nije u potpunosti validiran. Za preciznije određivanje vrsta i za epidemiološka istraživanja, koristi se analiza slijedova više lokusa (MLSA-od engl. *Multilocus Sequence Analysis*). U tu svrhu razvijeni su parovi početnica za još osam referentnih gena: *rpoA*, *recA*, *pyrH*, *gapA*, *mreB*, *ftsZ*, *gyrB* i *topA* (Sawabe i sur., 2007.).

Liječenje i preventiva

Dobra proizvođačka praksa koja podrazumijeva optimalne uvjete u uzgojnim jedinicama (kvalitete vode, zasićenosti kisikom, gustoće nasada, manipuliranje ribom) kao i primjena mjera biosigurnosti je veoma važna u sprječavanju ulaska uzročnika bolesti u farmu i širenja na sve uzgojne jedinice. Obzirom da to nije uvijek moguće, a da bi se spriječili visoki mortaliteti, ribu treba liječiti antibakterijskim tvarima. 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 (Ingliš i sur.,

1993.). Opažene su i razlike u osjetljivosti između i unutar sojeva ovisno o hranjivoj podlozi i koncentraciji antibakterijske tvari (Omeroglu i sur., 2009.). Osim urođene rezistencije, učestala uporaba antibakterijskih lijekova može pogodovati razvoju rezistencije te posljedičnu proliferaciju bakterije i jačanje virulencije (Thompson i sur., 2004.). Nadalje, dio lijekova primjenjenih u hrani se iz ekskrementa ili iz nekonzumirane hrane otapa te se taloži u sedimentu i predstavlja potencijalnu opasnost od razvoja antimikrobne rezistencije (Mary i sur., 2004.).

Sve unaprijed opisane činjenice ističu važnost primjene alternativnih mogućnosti liječenja poticanjem nespecifičnog i specifičnog imunogenog odgovora. Nakon prve primjene bakteriofaga u liječenju infekcije gofa bakterijom *Lactococcus garvinae* u Japanu (Nakai i sur., 1999.), provedeni su brojni pokusi liječenja bakterijskih infekcija ovom metodom (Kalatzis i sur., 2016., 2018.). Lazado i sur. (2011.) testirali su primjenu dviju probiotskih bakterija sa svojom adherencijom i utvrdili da one interferiraju sa svojom adherencijom patogenih bakterija smanjujući mogućnost infekcije.

Cijepljenje je jedan od mogućih i učinkovitih načina borbe protiv bolesti te se tako sprječava pojava bolesti u akvakulturi i reduciraju gubitci prouzročeni bolešću i smanjuje uporaba antibiotika. Produžavanje zaštitnog djelovanja može se postići dodatkom pomoćnih tvari (adjuvansa) bakterinima. Cjepiva na bazi inaktiviranih bakterija su se pokazale jako djelotvornim, a tome pridonosi i činjenica da je većina bakterijskih cjepiva koja se koriste u akvakulturi inaktivirano (Nguyen i sur., 2017.).

Zaključci

Obzirom da se, uz dobro poznatu infekciju bakterijom *Vibrio anguillarum*,

u mediteranskoj akvakulturi sve češće javljaju infekcije novim, visoko patogenim emergentnim sojevima *Vibrio harveyi*, potrebno je provesti istraživanja koja bi pridonijela razumijevanju ekonomski važne bolesti u uzgoju mediteranskih vrsta riba. Naime, uzevši u obzir činjenicu da je *V. harveyi* moguće izdvojiti iz okoliša, morskih organizama i probavnog trakta zdravih jedinki, očito je da postoje različiti sojevi iste bakterijske vrste te je potrebno definirati razlike između apatogenih i patogenih sojeva te optimizirati dijagnostičke metode za njihovu diferencijaciju. Osim toga, potrebno je istražiti i okolišne uvjete razvoja bolesti kao i testirati najjednostavnije, ekonomski najprihvatljivije i najučinkovitije načine preventivne i kontrole bolesti u uzgoju lubina i komarče.

Literatura

1. ALVAREZ, J. D., B. AUSTIN, A. M. ALVAREZ and H. REYES (1998): *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *J. Fish Dis.* 21, 313-316.
2. AUSTIN, B. and X. H. ZHANG (2006): *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 119-124.
3. BAI, F., L. PANG, Z. QI, J. CHEN, B. AUSTIN and X. H. ZHANG (2008): Distribution of five *Vibrio* virulence-related genes among *Vibrio harveyi* isolates. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54, 71-78.
4. BAUMANN, P., L. BAUMANN, S. S. BANG and M. J. WOOLKALIS (1981): Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia*, and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Beneckeia*. *Curr. Microbiol.* 4, 127-132.
5. BAUMANN, P., A. L. FURNISS and J. V. LEE (1984): Genus I. *Vibrio*. In: Bergey, D. H.: *Bergey's Manual of Syst. Bacteriol.* Baltimore, Maryland (518-538).
6. BULLER, N. B. (2004): *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual.* Wallingford: CABI Publishing.
7. CANO-GOMEZ, A., D. G. BOURNE, M. R. HALL, L. OWENS and L. HØJ (2009): Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: current methods and future prospects. *Aquaculture* 287, 1-10.
8. CHEN, X., S. WU, C. SHI and N. LI (2004): Isolation and identification of pathogenic *Vibrio*

- harveyi* from estuary cod *Epinephelus coioides*. J. Fish. Sci. China. 11, 313-317.
9. CONEJERO, M. J. and C. T. HEDREYDA (2003): Isolation of partial toxR gene of *Vibrio harveyi* and design of toxR-targeted PCR primers for species detection. J. Appl. Microbiol. 95, 602-611.
 10. CUI, J., X. T. FAN, W. Z. LIU, H. Y. LI, Y. C. ZHOU, S. F. WANG and Z. Y. XIE (2014): Isolation and identification of vibriosis pathogens of marine culture fishes in Southern China. Nat. Sci. J. Hai. Univ. 32, 245-251.
 11. DEL GIGIA-AGUIRRE, L., W. SÁNCHEZ-YEBRA-ROMERA, S. GARCÍA-MUÑOZ and M. RODRÍGUEZ-MARESCA (2017): First description of wound infection with *Vibrio harveyi* in Spain. N. Microbe N. Infect. 19, 15-16.
 12. FUKUI, Y. and T. SAWABE (2007): Improved one-step colony PCR detection of *Vibrio harveyi*. Microb. Environ. 22, 1-10.
 13. GOMEZ-GIL, B., F. L. THOMPSON, C. C. THOMPSON and J. SWINGS (2003): *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 239-243.
 14. HARRIS, L., L. OWENS and A. SMITH (1996): A Selective and Differential Medium for *Vibrio harveyi*. Appl. Environ. Microbiol. 9, 3548-3550.
 15. HENDRIE, M. S., W. HODGKISS and J. M. SHEWAN (1970): The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria. J. Gen. Microbiol. 64, 151-169.
 16. HERNÁNDEZ, C. R., C. H. L. MARTÍNEZ, A. A. DÍAZ, O. A. ROMERO, R. C. GODÍNEZ, G. A. ZAVALA and R. A. VERDUGO (2004): Aerobic bacterial flora of the nasal cavity in Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*). Vet. J. 170, 359-63.
 17. HUNDENBORN, J., S. THURIG, M. KOMMERELL, H. HAAG and O. NOLTE (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.
 18. INGLIS, V., R. J. ROBERTS and N. R. BROMAGE (1993): Bacterial diseases of fish. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
 19. JIRAVANICHPAISAL, P., T. MIYAZAKI and C. LIMSUWAN (1994): Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health. 6, 27-35.
 20. JOHNSON, F. H. and I. V. SHUNK (1936): An interesting new species of luminous bacteria. J. Bacteriol. 31, 585-593.
 21. KALATZIS, P. G., R. BASTÍAS, C. KOKKARI and P. KATHARIOS (2016): Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Gm1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. PLoS One. 11, e0151101.
 22. KALATZIS, P. G., D. CASTILLO, P. KATHARIOS and M. MIDDELBOE (2018): Bacteriophage Interactions with Marine Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy. Antibiotics 7, 15.
 23. KARUNASAGAR, I., R. PAI, G. R. MALATHI and I. KARUNASAGAR (1994): Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture 128, 203-209.
 24. LAVILLA-PITOGO, C. R., E. M. LEAÑO and M. G. PANER (1998): Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. Aquaculture 164, 337-349.
 25. LAZADO, C. C., C. M. CAIPANG, M. F. BRINCHMANN and V. KIRON (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.
 26. LI, J. and H. XU (1998): Isolation and biological characteristics of *Vibrio harveyi* affecting hatchery-related *Penaeus Chinensis* larvae. Oceanol. Limnol. Sinica. 29, 353-361.
 27. LIU, P. C., K. K. LEE and S. N. CHEN (1996a): Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tigerprawn, *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol. 22, 413-416.
 28. LIU, P. C., K. K. LEE, K. C. YII, G. H. KOU and S. N. CHEN (1996b): Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. Curr. Microbiol. 33, 129-132.
 29. MAHONEY, J. C., M. J. GERDING, S. H. JONES and C. A. WHISTLER (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.
 30. MARY, G., D. CALAMARI, P. GALLI, S. CASTIGLIONI, G. CROSA and R. FANELLI (2004): Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. Chemosphere 54, 661-668.
 31. NAKAI, T., R. SUGIMOTO, K. H. PARK, S. MATSUOKA, K. MORI, T. NISHIOKA and K. MARUYAMA (1999): Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellow tail. Dis. Aquat. Organ. 37, 33-41.
 32. NGUYEN, H. T., T. T. THU NGUYEN, M. A. TSAI, E. YA-ZHEN, P. C. WANG and S. C. CHEN (2017): A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Fish Shellfish Immunol. 65, 118-126.
 33. NISHIMORI, E., O. HASEGAWA, T. NUMATA and H. WAKABAYASHI (1998): *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. Fish Pathol. 33, 495-502.
 34. OAKEY, H. J., N. LEVY, D. G. BOURNE, B. CULLEN and A. THOMAS (2003): The use of

- PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. J. Appl. Microbiol. 95, 1293-1303.
35. OMEROGLU, E. E., I. KARABOZ and A. SUKATAR (2009): In vitro susceptibility of antibiotics against bioluminescent *Vibrio harveyi* TEM05 and TEMS1 isolated from *Holothuria tubulosa* and seawater. Fresen. Environ. Bull. 18, 2023-2028.
 36. PAKINGKING, R., N. B. BAUTISTA, D. CATEDRAL and E. G. DE JESUS-AYSON (2018): Characterisation of *Vibrio* isolates recovered from the eyes of cage-cultured pompano (*Trachinotus blochii*) infested with caligid parasites (*Lepeophtheirus spinifer*). B. Eur. Assoc. Fish Pat. 38, 35-41.
 37. PANG, L., X. H. ZHANG, Y. ZHONG, J. CHEN, Y. LI and B. AUSTIN (2006): Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene. Lett. Appl. Microbiol. 43, 249-255.
 38. PAVIA, A. T., J. A. BRYAN, K. L. MAHER, T. R. HESTER and J. J. FARMER (1989): *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. Ann. Intern. Med. 111, 85-86.
 39. PESCI, E. C. and B. H. IGLEWSKI (2003): Quorum sensing. In: Burns, D. L., J. T. Barbieri, B. H. Iglewski and R. Rappuoli: Bacterial Protein Toxins. Washington, DC (55-58).
 40. PIZZUTO, M. and R. G. HIRST (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.
 41. PRAYITNO, S. B. and J. W. LATCHFORD (1995): Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. Aquaculture 132, 105-112.
 42. PRETTO, T. (2018): Vibriosis caused by *Vibrio harveyi*: studies on pathogenesis and vaccine efficacy in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Disertacija. Sveučilište u Bolonji.
 43. PUJALTE, M. J., A. SITJA-BOBADILLA, M. C. MACLAN, C. BELLOCH, P. ALVAREZ-PELLITERO, J. PEREZ-SANCHEZ, F. URUBURU and E. GARAY (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.
 44. QIN, Y. X., J. WANG, Y. Q. SU, D. X. WANG and X. Z. CHEN (2006): Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. Acta Oceanol. Sinica. 25, 154-159.
 45. RATLEDGE, C. and L. G. DOVER (2003): Iron metabolism in pathogenic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 54, 881-941.
 46. REICHEL, J. L. and P. BAUMANN (1973): Taxonomy of the marine, luminous bacteria. Arch. Mikrobiol. 94, 283-330.
 47. RICO, R. M., S. TAPIA-PANIAGUA, E. MARTINEZ-MANZANARES, M. C. BALEBONA and M. A. MORIÑIGO (2008): Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). J. Appl. Microbiol. 105, 752-760.
 48. RUBY, E. G. and J. G. MORIN (1979): Luminous enteric bacteria of the marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion. Appl. Environ. Microbiol. 38, 406-411.
 49. RUWANDEEPIKA, H. A. D., T. S. P. JAYAWEERA, P. P. BHOWMICK, I. KARUNASAGAR, P. BOSSIER and T. DEFOIRDT (2012): Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. Rev. Aquaculture 4, 59-74.
 50. SAWABE, T., K. KITA-TSUKAMOTO and F. L. THOMPSON (2007): Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. J. Bacteriol. 189, 7932-7936.
 51. SUBRAMANIAN, S. and P. ROSAMMA (2013): Salinity a significant environmental factor for *Vibrio harveyi* virulence in *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture Res. 44, 10.
 52. TENDENCIA, E. A. (2002): *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. Aquaculture Res. 33, 455-458.
 53. THOMPSON, F. L., T. IIDA and J. SWINGS (2004): Biodiversity of vibrios. Microbiol. Mol. Biol. 68, 403-431.
 54. THEMPTANDER, K. (2005): Detection and characterisation of *Vibrio harveyi* isolates. Disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Upsali.
 55. URBANCZYK, H., Y. OGURA and I. T. HAYASH (2013): Taxonomic revision of *Harveyi* clade bacteria (family *Vibrionaceae*) based on analysis of whole genome sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 2742-2751.
 56. WILKINS, S., M. MILLAR, S. HEMSWORTH, G. JOHNSON, S. WARWICK and B. PIZER (2008): *Vibrio harveyi* sepsis in a child with cancer. Pediatr. Blood Cancer. 50, 891-892.
 57. WANG, X. H. and K. Y. LEUNG (2000): Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. Microbiology 146, 989-998.
 58. ZHANG, X. H. and B. AUSTIN (2000): Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. J. Fish Dis. 23, 93-102.
 59. ZHANG, X. Z., W. J. WEN, Y. Q. FENG, Z. Y. XIE and Y. C. ZHOU (2010): Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from proboscis intumescence disease in *Babylonia areolata*. Mar. Sci. 34, 7-12.

Emerging vibriosis of Mediterranean fish caused by the bacterial species *Vibrio harveyi*: an overview

Ivana Giovanna ZUPIČIĆ, DVM, Assistant, Željko PAVLINEC, mag. biol. mol., Assistant, Dražen ORAIĆ, PhD, Scientific Advisor, Snježana ZRNČIĆ, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute Zagreb, Croatia

Bacteria of the genus *Vibrio* spp. family *Vibrionaceae* are the most common causative agents of disease in aquatic animals. Economically, the members of the Harvey clade, with eleven closely related bacterial species, are the most important representatives of the genus *Vibrio*. *V. harveyi* is commonly found in the marine environment and is a normal part of the microflora of aquatic animals. Numerous strains are described as pathogens for crustaceans and molluscs. The prevalence of infection with *V. harveyi* is increasing and affecting more Mediterranean fish species, especially in the summer months. It is a Gram-negative, halophilic, aerobic or facultatively anaerobic bacteria. In general, it does not have zoonotic potential, though cases of human infection caused by this bacterium have been described. Some strains are highly pathogenic while others are considered opportunistic pathogens. The main virulence factors are bacterial flagellum, lytic enzymes, capsule, siderophores, hydrophobic surface antigens and its ability to adhere and infect epithelial host cells. Production of biofilm is a mechanism of antibiotic resistance, and

the ability of the bacteria to extract iron from host cells is crucial for their survival. The intracellular system allows intercellular communication between bacteria. Clinical signs are similar to other bacterial infections in fish, usually starting with lethargy and loss of appetite. *V. harveyi* has an innate resistance to certain antibiotics. Recently, bacteriophage therapy has been developed and is showing promising results. Vaccination is one of the most effective ways of preventing disease, reducing losses and reducing antibiotic use. Good manufacturing practice and application of biosecurity measures are very important to minimizing the risk of introducing an infectious disease and its spread to animals within a facility. More often, infections occur with highly pathogenic emergent strains of *V. harveyi*. Since *V. harveyi* can be extracted from the environment, marine organisms and the digestive tract of healthy individuals, it is evident that there are different strains of the same bacterial species and it is necessary to define the differences between non-pathogenic and pathogenic strains.

Key words: *V. Harveyi*; bacteria; treatment; prophylaxis