

 **Interreg**
Italy - Croatia
AdriaAquaNet



AdriaAquaNet

Jačanje inovacija i
održivosti u
jadranskoj
akvakulturi



**STRATEGIJA
CIJEPLJENJA U
MRIJESTILIŠTIMA I
UZGAJALIŠTIMA RIBA**



AdriaAquaNet

Jačanje inovacija i
održivosti u
jadranskoj
akvakulturi



STRATEGIJA CIJEPLJENJA U MRIJESTILIŠTIMA I UZGAJALIŠTIMA RIBA

ZAGREB, 2022.
HRVATSKI VETERINARSKI INSTITUT



Naziv projekta: AdriAquaNet – Enhancing Innovation and Sustainability in Adriatic Aquaculture

Prioritet: Plave inovacije

Trajanje: 01.01.2019. – 30.06.2022.

Koordinator: Sveučilište u Udinama, Italija

Odjel za znanost, poljoprivredu i zaštitu okoliša

Kontakt: Prof. Marco Galeotti

marco.galeotti@uniud.it

Naslov: Strategija cijepljenja u mrijestilištima i uzgajalištima riba

Nakladnik: Hrvatski veterinarski institut

Autori: dr.sc. Chiara Bulfon, Igor Cvitić, prof.dr.sc. Marco Galeotti, Danijel Mejdandžić, dr.med.vet., dr.sc. Dražen Oraić, dr.sc. Valentina Pacorig, izv.prof.dr.sc. Donatella Volpatti, Lea Vrbančić, mag.exp. biol., Ivana Giovanna Zupčić, dr.med.vet., dr.sc. Snježana Zrnčić

Urednik: dr.sc. Snježana Zrnčić i prof. dr. sc. Marco Galeotti

Grafička obrada: GENS94

Fotografije: Hrvatski veterinarski institut, Sveučilište u Udinama, Cromaris,d.d.

Tisak: PRINTERA Grupa d.o.o.

ISBN: 953-6836-26-2 (tiskano izdanje)

935-6836-27-0 (e-izdanje)

Sadržaj ove publikacije isključiva je odgovornost projektnih partnera i niti na koji način se ne može smatrati da odražava gledišta Europske Unije.

Sadržaj:

PREDGOVOR – Snježana Zrnčić i Marco Galeotti	7
1. UVOD – Snježana Zrnčić i Marco Galeotti	9
2. IMUNOLOŠKI SUSTAV KOMARČE (<i>SPARUS AURATA</i>) I LUBINA (<i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>) – Marco Galeotti i Donatella Volpatti	13
2.1. Uvod	13
2.2. Organi i stanice imunološkog sustava	14
2.2.1. Morfologija leukocita	14
2.3. Glavni mehanizmi nespecifičnog imunološkog odgovora	15
2.3.1. Komplement	15
2.3.2. Antimikrobni peptidi i lizozim	15
2.3.3. Fagocitoza i respiratorni prasak	16
2.3.4. Citokini	16
2.4. Glavni mehanizmi odgovora kod specifične imunosti	17
2.4.1. T i B limfociti - imunoglobulini	17
2.4.2. Molekule MHC (glavni kompleks histokompatibilnosti) i drugi imunoreceptori	17
3. GLAVNI BAKTERIJSKI UZROČNICI BOLESTI U JADRANSKOM MORU – Snježana Zrnčić	21
3.1. Vibrioza uzrokovana bakterijom <i>Vibrio anguillarum</i> – Dražen Oraić	22
3.1.1. Uzročnik	22
3.1.2. Infekcija i ekološki faktori	23
3.1.3. Klinički aspekti bolesti	23
3.1.4. Kontrola bolesti	24
3.2. Vibrioza uzrokovana bakterijom <i>Vibrio harveyi</i> – Ivana Giovanna Zupičić	26
3.2.1. Uzročnik	26
3.2.2. Infekcija i ekološki faktori	27
3.2.3. Klinički aspekti bolesti	27
3.2.4. Kontrola bolesti	28
3.3. Fotobakterioza uzrokovana bakterijom <i>Photobacterium damselae subsp. piscicida</i> – Marco Galeotti, Chiara Bulfon i Valentina Pacorig	30
3.3.1. Uzročnik	30

3.3.2. Infekcija, patogeneza i okolišni faktori	31
3.3.3. Klinički aspekti bolesti	31
3.3.4. Kontrola bolesti	33
3.4. Tenacibakuloza uzrokovana bakterijom	
<i>Tenacibaculum maritimum</i> – Snježana Zrnčić i Lea Vrbančić	37
3.4.1. Uzročnik	37
3.4.2. Infekcija i ekološki faktori	38
3.4.3. Klinički aspekti bolesti	38
3.4.4. Kontrola bolesti	39
4. CIJEPLJENJE I STRATEGIJA CIJEPLJENJA – Snježana Zrnčić i Dražen Oraić	41
4.1. Uvod	41
4.1.1. Vrste cjepiva	41
4.1.2. Primjena cjepiva	42
4.2. Popis dostupnih komercijalnih cjepiva	44
4.3. Cijepljenje u mrijestilištima – Dražen Oraić i Danijel Mejdandžić	46
4.4. Docjepljivanje na uzgajalištima – Snježana Zrnčić	49
4.4.1. Docjepljivanje uranjanjem – Snježana Zrnčić i Igor Cvitić	50
4.4.2. Docjepljivanje injekcijom – Dražen Oraić i Danijel Mejdandžić	54

PREGOVOR

„AdriAquaNet (Poticanje inovacije i unaprjeđenje održivosti jadranske akvakulture; u eng. izvorniku: *Enhancing Innovation and Sustainability in Adriatic Aquaculture*)“ suradni je talijansko-hrvatski projekt u sklopu Interreg programa (V-A 2014-2020) i spada u prioritetnu skupinu 1 „Inovacije u plavom gospodarstvu – unaprijedite radni okvir za inovacije u relevantnim sektorima plavoga gospodarstva unutar suradnoga područja“ (u eng. izvorniku: *“Blue innovation – Enhance the framework conditions for innovation in the relevant sectors of the blue economy within the cooperation area”*).

Glavni cilj projekta jest osnažiti održivu akvakulturu u Jadranskom more transferom naprednih znanja i novih tehnologija kroz cjelokupni lanac vrijednosti u akvakulturi, počevši od upravljanja proizvodnjom na uzgajalištu riba pa sve do plasmana obrađenoga proizvoda na tržište. Projekt je započet s ciljem da utječe na tri aspekta vrijednosnoga lanca, kako slijedi:

1. Unaprjeđenje uzgoja primjenom inovativnih formulacija riblje hrane i inovativnog postupka hranidbe u cilju poboljšanja kvalitete ribe i zaštite okoliša uz istodobno uvođenje tehnologije koja omogućava uštedu energije.
2. Uvođenje novoga pristupa upravljanju zdravljem i dobrobiti cijepljenjem protiv bakterijskih infekcija i primjenom prirodnih supstanci u liječenju.
3. Razvijanje smjernica namijenjenih potrošačima ribe temeljem procjene zdravstvene ispravnosti i kvalitete, senzoričkih i nutritivnih svojstava kao i zdravstvenih dobrobiti konzumacije te, u konačnici, prezentacije svih ovih podataka i činjeničnoga stanja potrošačima u jadranskoj regiji sveobuhvatnom marketinškom kampanjom.

Priručnik „Strategija cijepljenja u jadranskoj akvakulturi“ je dokument namijenjen uzgajivačima lubina i komarče, veterinarima uključenim u upravljanje zdravljem u jadranskoj akvakulturi, predstavnicima farmaceutske industrije i svim ostalim dionicima uključenim u zdravlje riba. Dokument pruža osnovne informacije o imunosnom sustavu

riba pružajući osnovna saznanja potrebna da se shvati važnost imunoprofilakse u uzgoju, pregled ekonomski najznačajnijih bakterijskih bolesti i praktične savjete tijekom provođenja cijepljenja. Na taj način su objašnjene aktivnosti i istraživanja realizirana u okviru radnog paketa 4 „Inovacije u upravljanju zdravljem“ projektni zadatak 4.1. Proizvodnja i testiranje učinkovitosti autolognih cjepiva protiv bakterijskih infekcija uzrokovanih bakterijom *Vibrio harveyi* i *Tenacibaculum maritimum*.

Autori su suradnici u AdriaAquaNet projektu i vodeći su stručnjaci u području upravljanja zdravljem riba u Italiji i Hrvatskoj, a navedeni su abecednim redom:

- Chiara Bulfon** – Sveučilište u Udinama, Odjel za znanosti o agrohrani, okolišu i životinjama
- Igor Cvitić** – Uzgajalište Friškina d.o.o., Split
- Marco Galeotti** – Sveučilište u Udinama, Odjel za znanosti o agrohrani, okolišu i životinjama
- Danijel Mejdandžić** – Cromaris, d.d.
- Dražen Oraić** – Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba
- Valentina Pacorig** – Sveučilište u Udinama, Odjel za znanosti o agrohrani, okolišu i životinjama
- Donatella Volpatti** – Sveučilište u Udinama, Odjel za znanosti o agrohrani, okolišu i životinjama
- Lea Vrbančić** – Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba
- Ivana Giovanna Zupčić** – Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba
- Snježana Zrnčić** – Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

Iako nisu partneri u ovom projektu, Cromaris, d.d. je iskazao veliku spremnost na suradnju u vidu donacija mlađa za pokuse ili dijeljenja iskustava i foto dokumentacije te im se stoga iskreno zahvaljujemo.

Snježana Zrnčić i Marco Galeotti

1. UVOD

Snježana Zrnčić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

Marco Galeotti

Sveučilište u Udinama, Odjel za agrohranu, znanost o okolišu i životinjama

Uzgoj lubina (*Dicentrarchus labrax*) i komarče (*Sparus aurata*) je iznimno važna aktivnost u jadranskom moru, kako uz talijansku tako i uz hrvatsku obalu. Zarazne bolesti predstavljaju ključnu prepreku u razvoju industrije akvakulture (Sánchez i sur. 2021). Iako morski okoliš podržava preživljavanje bakterija izvan domaćina, samo malen broj bakterija u sredozemnom morskom okolišu može izazvati bolest (Pujalte i sur. 2003). Najčešći, najštetniji i ekonomski najznačajniji bakterijski uzročnici koji uzrokuju gubitke u uzgoju lubina i komarče, su bakterije porodice *Vibrionaceae*, točnije bakterije *Vibrio anguillarum* i *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* te, u posljednje vrijeme sve važniji uzročnik bolesti, bakterija *Vibrio harveyi* (Mancuso 2014). Pored infekcija uzrokovanih prethodno spomenutim bakterijama, infekcije uzorkovane bakterijom *Tenacibaculum spp.* ubrajaju se u najvažnije bolesti lubina (Zrnčić i Pavlinec 2020). Međutim, pojava bakterijskih bolesti nije nužno uzrokovana jednom bakterijom već može uključivati sinergijsku interakciju dviju ili više vrsta. Bakterijske infekcije uzrokuju visoke mortalitete, a gubici se mogu ublažiti tretmanima kemikalijama i antibioticima (Soliman i sur. 2019). Iako korištenje antibiotika može uspješno smanjiti gubitke, njihova je opetovana uporaba povezana s potencijalno negativnim ishodom kao što su antimikrobna rezistencija te rezidue antibiotika u morskom okolišu i hrani iz mora.

Kao i za druge vrste kralježnjaka, cijepljenje je ključna komponenta za održivi uzgoj zdravih riba (Miccoli i sur. 2019). Cijepljenje je prepoznato kao neophodan pristup smanjenju uporabe antibiotika u industriji akvakulture (Adams 2019). Povećana učestalost bakterija rezistentnih na anitmikrobne tvari te opasnosti za sigurnost hrane mogle bi biti smanjene primjenom strategije cijepljenja koja je izrazito učinkovita i ekonomična u zaštiti zdravlja riba od različitih uzročnika bolesti i omogućava ekološki prihvatljivu akvakulturu i sigurne izvore hrane (AAC 2018). Cijepljenje bi trebalo biti dio odgovornog programa upravljanja zdravljem riba te također temeljito isplanirano i očekivano što znači da ono nije kratkoročno rješenje zdravstvenih problema. Temeljem redovitog nadziranja/praćenja pojave bolesti, uzgajivači riba bi zajedno sa stručnjacima za zdravlje riba trebali isplanirati program cijepljenja kako bi se postigla djelotvorna zaštita.

Uzevši u obzir sve prethodno spomenute činjenice, projekt AdriAquaNet je, među

ostalim aspektima poboljšanja održivosti morske akvakulture Jadrana, uključio cijepljenje kao ključan pokretač održivosti.

Sa ciljem promocije cijepljenja i poticanja primjene cjepiva u uzgoju lubina i komarče, aktivnosti projekta usmjerili smo na dvije teme:

- i. Proizvodnja autogenih cjepiva protiv bakterija *Vibrio harveyi* i *Tenacibaculum maritimum* te laboratorijsko i terensko testiranje učinkovitosti
- i. Priprema i izrada dokumenta „Strategija cijepljenja za mrijestilišta i uzgajališta riba“

Publikacija „Strategija cijepljenja za mrijestilišta i uzgajališta riba“ osmišljena je kao priručnik s najvažnijim informacijama o ulozi cijepljenja u upravljanju bakterijskim bolestima u jadranskoj morskoj akvakulturi te sadrži slijedeća poglavlja:

- Poglavlje 2 „Imunosni sustav komarče (*Sparus aurata*) i lubina (*Dicentrarchus labrax*)“ pruža osnovne informacije o imunološkom sustavu riba te objašnjava koji organi imaju ulogu u zaštiti protiv uzročnika bolesti, koji su zaštitni imunosni mehanizmi kod riba te kako ribe imaju koristi od cjepiva
- Poglavlje 3 „Glavni uzročnici zaraznih bolesti u Jadranskom moru“ bavi se najpatogenijim bakterijskim uzročnicima bolesti pružajući osnovne informacije o bakterijama, mehanizmima infekcije, ekološkim uvjetima potrebnima za razvoj bolesti, kliničkim aspektima bolesti te načinima upravljanja bolestima
- Poglavlje 4 “Cijepljenje i strategija cijepljenja” bavi se cijepljenjem te informira čitatelje o različitim cjepivima, pružajući popis dostupnih komercijalnih cjepiva, upućujući kako pripremiti plan cijepljenja i kako provesti cijepljenje u mrijestilištima te opisuje postupke docjepljivanja uranjanjem i injekcijom tijekom kaveznog uzgoja

Nadamo se da će ovaj dokument pomoći odgovornima za upravljanje zdravljem riba, uzgajivačima te konzultantima u postavljanju učinkovitog pristupa cijepljenju, odabiru optimalnog cjepiva te uspješnom sprječavanju bakterijskih bolesti u jadranskoj morskoj akvakulturi. Takvo će postignuće pridonijeti održivosti regionalnog sektora akvakulture koja je važna za zdravlje potrošača te očuvanje zdravog okoliša.

Literatura:

Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & shellfish immunology*, 90, 210-214.

Aquaculture Advisory Council (AAC). 2018. Relevance of the availability of effective vaccines in aquaculture. Position Paper – February 2018. pp 9

Sánchez, J. L. F., Le Breton, A., Brun, E., Vendramin, N., Spiliopoulos, G., Furones, D., & Basurco, B. (2022). Assessing the economic impact of diseases in Mediterranean grow-out farms culturing European sea bass. *Aquaculture*, 547, 737530.

Mancuso, M. (2014). Emerging Bacterial Pathologies in Mediterranean Mariculture. *Journal of Aquaculture and Research*, 1, 1-2.

Miccoli, A., Saraceni, P. R., & Scapigliati, G. (2019). Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish & shellfish immunology*, 94, 800-809.

- Pujalte, M. J., Sitjà-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., & Garay, E. (2003). Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Diseases of aquatic organisms*, 54(2), 119-126.
- Soliman, W. S., Shaapan, R. M., Mohamed, L. A., & Gayed, S. S. (2019). Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy. *Open veterinary journal*, 9(3), 190-195.
- Zrnčić, S., & Pavlinec, Ž. (2020). Introduction to bacterial diseases. In. Zrnčić, S. (Ed.), Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture. *Options Mediterraneennes Serie B, Etudes et Researches* n. 75. CIHEAM, Zaragoza, pp. 63-66.; <http://om.ciheam.org/om/pdf/b75/oooo7940.pdf>

2. IMUNOLOŠKI SUSTAV KOMARČE (*SPARUS AURATA*) I LUBINA (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

Marco Galeotti i Donatella Volpatti

Sveučilište u Udinama, Odjel za agrohranu, znanost o okolišu i životinjama

2.1. Uvod

Lubin (*Dicentrarchus labrax*) i komarča (*Sparus aurata*) najvažnije su vrste morskih riba u području Sredozemlja (<https://feap.info/wp-content/uploads/2022/03/production-report>). Njihova komercijalna važnost potaknula je interes istraživača za aspekte koji se odnose na imunski odgovor i zaštitu od bolesti. Podaci o genomu objavljeni su za obje vrste (Tine i sur. 2014, Pauletto i sur. 2018), a dostupna su i neka antitijela za označavanje imunoglobulina i populacija leukocita (Tablica 1). Uvidom u znanstvenu literaturu (baze podataka SCOPUS i WOS) proizlazi da je komarča uglavnom bila predmet imunoloških istraživanja španjolskih istraživača, dok su lubina uglavnom proučavali talijanski istraživači. Sadašnja razina znanja o morfologiji i funkciji imunskog sustava u ove dvije vrste je vrlo visoka i definitivno usporediva s onom koja se odnosi na ekonomski relevantnije slatkovodne vrste salmonida i ciprinida ili vrste zebrica koja je važna iz eksperimentalnih razloga. U ovom poglavlju priručnika pokušat ćemo sažeti glavne morfološko-funkcionalne aspekte koji se odnose na imunološki odgovor dviju vrsta riba koje su fokus naših istraživanja.

Tablica 1. Anti imunoglobulinska/leukocitna protutijela za vrste komarču i lubina, upotrebljiva u dijagnostičke i istraživačke svrhe

Ciljane vrste	Komarča	Lubin
Protutijela za imunoglobuline	Komercijalna <ul style="list-style-type: none">IgM https://aquaticdiagnostics.com/IgT https://ximbio.com/reagent/153529/anti-igt-z55f8c3https://bocascientific.com/	Nekomercijalni <ul style="list-style-type: none">IgM (DLIg3 mAb e pAb)IgT pAbIgD pAb Ref. Prof. Scapigliati unitus Komercijalna <ul style="list-style-type: none">IgM mAb https://aquaticdiagnostics.com/
Protutijela za leukocite	Komercijalna <ul style="list-style-type: none">G7 – specifična za acidofilne granulociteMakrofagne kolonije-stimulirajući receptori Ref. Prof. Mulero Univ. Murcia	Nekomercijalni <ul style="list-style-type: none">Timociti (DTL15 mAb)Limfociti T CD3 pAb Ref. Prof. Scapigliati unitus

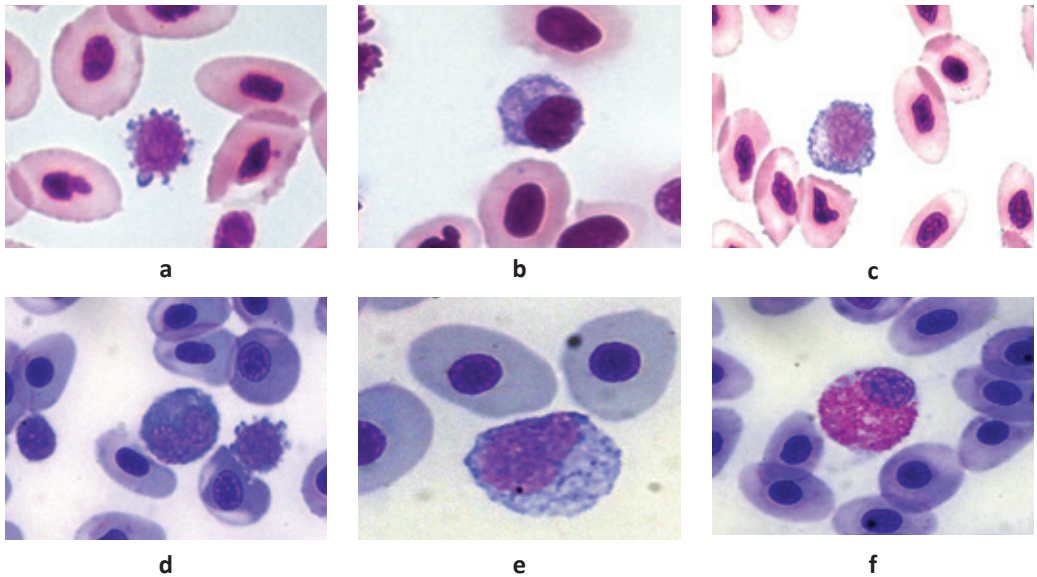
2.2. Organi i stanice imunološkog sustava

Kao i svi kralježnjaci, ribe imaju humoralni i stanični imunološki odgovor, urođen i specifičan, s određenim razlikama u odnosu na sisavce, posebno u smislu učinkovitosti odgovora. Općenito govoreći, možemo reći da se ribe oslanjaju prije svega na mehanizme urođene (nespecifične) imunosti u borbi protiv infektivnih agensa. Glavni organi limfo-hematopoetskog sustava su timus, prednji bubreg i slezena (Bjørngen i Koppang 2022). Timus je parni organ, smješten u škržnoj šupljini, a uglavnom je odgovoran za proizvodnju limfocita T. Prednji bubreg, smješten u cefaličnom području ispod kralježnice, može se funkcionalno usporediti s koštanom srži sisavaca, a u njemu se produciraju nezreli i zreli oblici fagocitnih stanica (monociti i granulociti) sa sposobnošću za prezentaciju antigena, limfocita, melanomakrofaga. Tu se odvija sinteza antitijela (IgM). Slezena je sekundarni limfoidni organ i nalazi se u trbušnoj šupljini. Sadrži limfocite i makrofage, koji sudjeluju u "hvatanju" antigena. Antigeni obrađeni na razini ovog organa smatraju se promotorima razvoja imunskog pamćenja. Na temelju studija ontogeneze provedenih 1990-ih, pokazalo se da je u ličinki komarče i lubina pojava limfnih organa već potpuna 25-30 dana nakon valjenja (Josefsson i Tatner 1993, Quesada i sur. 1994, Abelli i sur. 1996, Galeotti i Beraldo osobna zapažanja) Kod riba se velika važnost pridaje i organima odgovornim za imunitet sluznice. Oni predstavljaju fizičku barijeru koja odvaja ribu od vanjskog okruženja i smatraju se imunološki aktivnim mjestima u zaštiti od uzročnika bolesti. Limfoidna tkiva povezana sa sluznicama zajednički su definirana akronimom MALT (od engl. mucoid associated lymphoid tissue). Točnije, upućuje se na limfoidno tkivo povezano s crijevima (gut associated lymphoid tissue - GALT), kožom (skin associated lymphoid tissue - SALT), škrgama (gills associated lymphoid tissue - GIALT), nosom i ždrijelom (nasal associated lymphoid tissue - NALT) (Gomez i sur. 2013, Salinas 2015). Svi ovi organi su naseljeni T i B limfocitima, granulocitima, monocitima-makrofagima, eozinofilnim granularnim stanicama (engl. eosinophilic granular cells - EGC), međutim, raspoređeni su na manje organiziran način nego što je to uočeno u limfnim organima bez sluznice.

Imunitet povezan sa sluznicama trenutno je predmet brojnih istraživanja i kod komarče i kod lubina, jer se prvi uključuje u obrambene procese, a njezino djelovanje modulira kontinuirani kontakt s mikrobiotom (bakterijama prirodno povezanim sa sluznicama) (Panteli i sur. 2020, Picchiatti i sur. 2021).

2.2.1. Morfologija leukocita

Slijedeća slika ilustrira morfologiju glavnih populacija leukocita u komarče i lubina (Slika 1).



Slika 1. Krvni razmaz obojen po Giemsi. Lubin: limfocit (a), monocit (b), neutrofilni granulocit (c). Komarča: monocit i limfocit (d), neutrofilni granulocit (e), acidofilni granulocit (f).

2.3. Glavni mehanizmi nespecifičnog imunološkog odgovora

2.3.1. Komplement

Komplement je sustav koji se sastoji od više od 35 proteina koji imaju temeljnu ulogu u urođenoj imunosti i odgovorni su za prepoznavanje mikrobnih čestica i njihovu fagocitozu ili lizu stanica. Sustav komplementa može se aktivirati putem tri puta: klasičnog puta (CCP, put ovisan o antitijelima), alternativnim putem (ACP, put neovisan o antitijelima) i lektinskog puta (LCP). Teleosti posjeduju učinkovit sustav komplementa (Boshra i Sunyer 2006) koji je opisan u ograničenom broju ribljih vrsta, uključujući komarču (Sunyer i sur. 1997) i lubina. Jedno od najzanimljivijih svojstava komplementa riba koštunjača pronađeno je u nekim od njegovih specifičnih komponenti (C3 i faktor B), prisutnih u više izoformi (slični oblici koji se razlikuju po malim strukturnim razlikama) kodiranih različitim genima, sposobnih za značajno širenje spektra prepoznatih uzročnika bolesti. Različite izoforme C3 identificirane su i kod lubina i komarče (Mauri i sur. 2011).

2.3.2. Antimikrobni peptidi i lizozim

Antimikrobni peptidi (AMP) su male molekule (12-50 aminokiselina) koje čine važan dio antimikrobnog i imunomodulatornog urođenog obrambenog sustava riba. Tijekom

posljednjih dvadeset godina različiti istraživači proučavali su biološku ulogu AMP i ekspresiju gena i kod lubina i kod komarče (Cuesta i sur. 2008, Terova i sur. 2009, Barroso i sur. 2020-21, Valero i sur. 2020, Cervera i sur. 2022). U ove dvije vrste riba je do danas opisano desetak peptida koji pripadaju sljedećim skupinama: beta-defenzini, NK-lizini, piscidini, hepcidini, H1-H4 histoni, dicentracin (specifični za lubina). AMP se sintetizira i u različitim organima (sluznice, jetra, limfni organi), ali i u citoplazmi upalnih stanica kao što su monociti-makrofagi, acidofilni granulociti i eozinofilne granularne stanice (EGC). Njihova ekspresija i sinteza ovise o razvijenosti imunskog sustava i izloženosti ribe virusnim, bakterijskim i parazitarim infekcijama. Osim peptida, važno nespecifično antibakterijsko djelovanje ima i lizozim. Ova enzimska molekula s litičkim djelovanjem i posebice aktivna protiv Gram pozitivnih bakterija se sintetizira u jetrenim stanicama i makrofagima (Saurabh i Sahoo 2008, Li i sur. 2021). Nekoliko studija provedenih na lubinu i komarči razmatraju procjenu aktivnosti lizozima u biološkim matricama kao što su serum i sluz sa ciljem kvantifikacije učinkovitost ovog parametra urođenog humoralnog imuniteta u primjeraka podvrgnutih eksperimentalnim dijetama, cijepljenju/ imunostimulacijskim tretmanima ili tijekom bolesti (Buonocore i sur. 2014, Carbone i sur. 2016).

2.3.3. Fagocitoza i respiratorni prasak

Kod komarče i lubina fagocitoza je glavni mehanizam stanično posredovane imunosti, usmjerene na internalizaciju i inaktivaciju mikroorganizama, staničnih ostataka ili drugog stranog materijala (Esteban 1997). To je proces nespecifične imunosti, ali ga može stimulirati prisustvo specifičnih opsonizirajućih protutijela za određeni uzročnik bolesti. Membrana fagocita ima receptore za ligande koji se sami eksprimiraju na ciljnoj površini. Ubijanje fagocitiranih mikroorganizama događa se zahvaljujući oslobađanju litičkih enzima, produkata reaktivnog kisika (ROS) i dušika (NO). Oslobađanje ROS-a molekula je definirano kao respiratorni prasak i može se kvantificirati u laboratoriju kao parametar učinkovitosti nespecifične imunosti (Galeotti i sur. 2013).

2.3.4. Citokini

Temeljna klasa molekula uključenih u imunski sustav su citokini koji imaju središnju ulogu u urođenim i stečenim obrambenim sustavima te u regulaciji upalnog odgovora. Provedene studije, posebno na koštunjačama, potvrdile su u ribama prisutnost funkcionalnih homologa citokinima sisavaca (Secombes i sur. 1996, Buchmann 2014). Brojne studije posvećene su karakterizaciji ovih molekula i njihovoj ulozi tijekom upalnog odgovora u različitim stanjima i kod komarče i lubina (Scapigliati i sur. 2001, Castellana i sur. 2013, Roman i sur. 2013, Cordero i sur. 2016, Reyes-Lopez i sur. 2018, Miccoli i sur. 2021).

2.4. Glavni mehanizmi odgovora kod specifične imunosti

2.4.1. T i B limfociti - imunoglobulini

Glavni akteri specifičnog imunosnog sustava riba su limfociti (T i B) i imunoglobulini (Ig). Ribe su prvi kralježnjaci na evolucijskoj ljestvici koji posjeduju ove komponente, što rezultira značajnom prijelaznom točkom između urođenog i stečenog imuniteta. Kronološki gledano, ovaj se fenomen dogodio prije oko 450 milijuna godina (Tort 2003, Sunyer 2013, Flajnik i sur. 2018). Mnoga znanstvena istraživanja pokazala su da je stečeni imunosni sustav riba manje učinkovit nego kod sisavaca. Kod koštunjača, u usporedbi sa sisavcima, nema "izotipskog prebacivanja" antitijela iz klase IgM u klasu IgG, a nema ni limfnih čvorova i limfnih folikula. Ontogenezu limfocita proučavali su u lubina Dos Santos i sur. (2000) i Rombout i sur. (2005) te pokazuju da se T stanice u glavnim limfnim organima pojavljuju 28 do 45 dana nakon valjenja, dok se B stanice pojavljuju 45 do 90 dana nakon valjenja. Razine T i B limfocita slične onima kod odraslih jedinki postižu se oko 137-145 dana nakon valjenja, što sugerira da je lubin imunološki "zreo" počevši od ove faze. Prijenos majčinih protutijela (IgM) na jajašca i embrij je dokazan kod komarče i lubina zahvaljujući radovima Picchietti i sur. (2004), Hanif i sur. (2005). Na temelju ovih zapažanja moguće je predložiti planove cijepjenja matičnih štokova ovih vrsta kako bi se zaštita od uzročnika bolesti, karakterizirana specifičnim antitijelima, prenijela i na potomstvo. Kod komarče i lubina najznačajnija je klasa antitijela IgM, tetramerne molekule koje se sastoje od 4 monomerne jedinice međusobno povezane J lancima. One predstavljaju najrasprostranjenija antitijela u serumu, dok je njihova koncentracija u kožnoj i crijevnoj sluzi vrlo niska. Izlučuju ih uglavnom plazma stanice prednjeg bubrega. Nakon cijepjenja uočeno je značajno povećanje titra IgM u serumu, a taj proces koji ovisi o temperaturi. Protutijela klase IgT također su nedavno otkrivena u komarče i lubina (Piazzon i sur. 2016, Buonocore i sur. 2017), slično kao što je već uočeno kod kalifornijske pastrve i zebrice. IgD je identificiran samo u lubina. IgT, s obzirom na mjesto izlučivanja plazma stanica (koža / crijeva / škrge), smatraju se dijelom imuniteta sluznice, sa sličnom ulogom kao IgA sisavaca. Općenito, funkcije ribljih antitijela su slične onima kod sisavaca.

2.4.2. Molekule MHC (glavni kompleks histokompatibilnosti) i drugi imunoreceptori

Molekule MHC klase I i II su proteini koji se eksprimiraju na staničnoj membrani, a sposobni su predstaviti antigene peptide (Wegner 2008) T limfocitima i pokrenuti obrambeni imunosni odgovor. Njihova je struktura slična strukturi sisavaca i uključuje dvije podjedinice α i β (Buonocore i sur. 2007.). Geni koji kodiraju ove proteine, već identificirani u više od trideset vrsta teleosta (Dixon i sur. 2001, Buonocore i sur. 2007),

karakterizirani su izuzetnim polimorfizmom na kojem se temelji varijabilnost individualne otpornosti na bolesti. Kod ostalih teleosta, lubina (Buonocore i sur. 2007, Pinto i sur. 2013, Ratcliffe i sur. 2022) i komarče (Cuesta i sur. 2006, Randelli i sur. 2008) su identificirani geni koji kodiraju molekule MHC klase I i II, a proteini koji se njima eksprimiraju su karakterizirani djelomično. Neki „toll like“ receptori su identificirani u lubina (TLR1, TLR2, TLR9) (Ortiz i sur. 2014).

Literatura

- Abelli, L., Gallo, V. P., Civinini, A., & Mastroli, L. (1996). Immunohistochemical and Ultrastructural Evidence of Adrenal Chromaffin Cell Subtypes in Sea Bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *General and comparative endocrinology*, 102(1), 113-122.
- Barroso, C., Carvalho, P., Carvalho, C., Santarém, N., Gonçalves, J. F., Rodrigues, P. N., & Neves, J. V. (2020). The diverse piscidin repertoire of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Molecular characterization and antimicrobial activities. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4613.
- Björger, H., & Koppang, E. O. (2022). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Principles of Fish Immunology*, 1-30.
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 239-262.
- Buchmann, K. (2014). Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in immunology*, 5, 459.
- Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Costantini, S., Facchiano, A., Scapigliati, G., & Stet, R. J. (2007). Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II β chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish & shellfish immunology*, 23(4), 853-866.
- Buonocore, F., Randelli, E., Trisolino, P., Facchiano, A., de Pascale, D., & Scapigliati, G. (2014). Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Molecular Immunology*, 62(1), 10-18.
- Buonocore, F., Stocchi, V., Nunez-Ortiz, N., Randelli, E., Gerdol, M., Pallavicini, A., ... & Picchietti, S. (2017). Immunoglobulin T from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): molecular characterization, tissue localization and expression after nodavirus infection. *BMC molecular biology*, 18(1), 1-14.
- Carbone, D., & Faggio, C. (2016). Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 172-178.
- Castellana, B., Marín-Juez, R., & Planas, J. V. (2013). Transcriptional regulation of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) interleukin-6 gene promoter. *Fish & shellfish immunology*, 35(1), 71-78.
- Cervera, L., González-Fernández, C., Arizcun, M., Cuesta, A., & Chaves-Pozo, E. (2022). Severe Natural Outbreak of Cryptocaryon irritans in Gilthead Seabream Produces Leukocyte Mobilization and Innate Immunity at the Gill Tissue. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 937.
- Cordero, H., Mauro, M., Cuesta, A., Cammarata, M., & Esteban, M. Á. (2016). In vitro cytokine profile revealed differences from dorsal and ventral skin susceptibility to pathogen-probiotic interaction in gilthead seabream. *Fish & shellfish immunology*, 56, 188-191.
- Cuesta, A., Esteban, M. Á., & Meseguer, J. (2006). Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular immunology*, 43(8), 1275-1285.
- Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2008). The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Molecular immunology*, 45(8), 2333-2342.
- Dixon, B., & Stet, R. J. M. (2001). The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 683-699.
- dos Santos, N. M., Romano, N., de Sousa, M., Ellis, A. E., & Rombout, J. H. (2000). Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish & shellfish immunology*, 10(7), 583-596.
- Esteban, M. A., & Meseguer, J. (1997). Factors influencing phagocytic response of macrophages from the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural and quantitative study. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 248(4), 533-541.

- Flajnik, M. F. (2018). A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(7), 438-453.
- Galeotti, M., Romano, N., Volpatti, D., Bulfon, C., Brunetti, A., Tiscar, P. G., ... & Abelli, L. (2013). Innovative vaccination protocol against vibriosis in *Dicentrarchus labrax* (L.) juveniles: Improvement of immune parameters and protection to challenge. *Vaccine*, 31(8), 1224-1230.
- Gomez, D., Sunyer, J. O., & Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1729-1739.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Leonardos, I., & Dimitriadis, G. J. (2005). The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish & shellfish immunology*, 19(4), 345-361.
- <https://feap.info/wp-content/uploads/2022/03/production-report>
- <https://aquaticdiagnostics.com/>
- <https://ximbio.com/reagent/153529/anti-igt-z55f8c3>
- <https://bocascientific.com/>
- <https://aquaticdiagnostics.com/>
- Jósefsson, S., & Tatner, M. F. (1993). Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 3(1), 35-49.
- Li, J., Jiang, X., Li, H., Gelinsky, M., & Gu, Z. (2021). Tailoring materials for modulation of macrophage fate. *Advanced Materials*, 33(12), 2004172.
- Mauri, I., Roher, N., MacKenzie, S., Romero, A., Machado, M., Balasch, J. C., ... & Tort, L. (2011). Molecular cloning and characterization of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead seabream (*Sparus aurata*) complement component C3. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(6), 1310-1322.
- Miccoli, A., Buonocore, F., Picchietti, S., & Scapigliati, G. (2021). The sea bass *Dicentrarchus labrax* as a marine model species in immunology: Insights from basic and applied research. *Aquaculture and Fisheries*.
- Ortiz, N. N., Gerdol, M., Stocchi, V., Marozzi, C., Randelli, E., Bernini, C., ... & Scapigliati, G. (2014). T cell transcripts and T cell activities in the gills of the teleost fish sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental & Comparative Immunology*, 47(2), 309-318.
- Panteli, N., Mastoraki, M., Lazarina, M., Chatzifotis, S., Mente, E., Kormas, K. A., & Antonopoulou, E. (2021). Configuration of gut microbiota structure and potential functionality in two teleosts under the influence of dietary insect meals. *Microorganisms*, 9(4), 699.
- Pauletto, M., Manousaki, T., Ferrareso, S., Babbucci, M., Tsakogiannis, A., Louro, B., ... & Bargelloni, L. (2018). Genomic analysis of *Sparus aurata* reveals the evolutionary dynamics of sex-biased genes in a sequential hermaphrodite fish. *Communications biology*, 1(1), 1-13.
- Piazzon, M. C., Galindo-Villegas, J., Pereiro, P., Estensoro, I., Calduch-Giner, J. A., Gómez-Casado, E., ... & Pérez-Sánchez, J. (2016). Differential modulation of IgT and IgM upon parasitic, bacterial, viral, and dietary challenges in a perciform fish. *Frontiers in immunology*, 7, 637.
- Picchietti, S., Buonocore, F., Guerra, L., Belardinelli, M. C., De Wolf, T., Couto, A., ... & Scapigliati, G. (2021). Molecular and cellular characterization of European sea bass CD3ε+ T lymphocytes and their modulation by microalgal feed supplementation. *Cell and Tissue Research*, 384(1), 149-165.
- Picchietti, S., Taddei, A. R., Scapigliati, G., Buonocore, F., Fausto, A. M., Romano, N., ... & Abelli, L. (2004). Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell and tissue research*, 315(2), 259-270.
- Pinto, R. D., Randelli, E., Buonocore, F., Pereira, P. J., & dos Santos, N. M. (2013). Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) MHC class I heavy chain and β2-microglobulin. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(3), 234-254.
- Quesada, J., Villena, M. I., & Navarro, V. (1994). Ontogeny of the sea bass spleen (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopic study. *Journal of morphology*, 221(2), 161-176.
- Randelli, E., Scala, V., Casani, D., Costantini, S., Facchiano, A., Mazzini, M., ... & Buonocore, F. (2008). T cell receptor beta chain from sea bream (*Sparus aurata*): molecular cloning, expression and modelling of the complexes with MHC class I. *Molecular Immunology*, 45(7), 2017-2027.
- Ratcliffe, F. C., Garcia de Leaniz, C., & Consuegra, S. (2022). MHC class I-α population differentiation in a commercial fish, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animal Genetics*.
- Reyes-López, F. E., Aerts, J., Vallejos-Vidal, E., Ampe, B., Dierckens, K., Tort, L., & Bossier, P. (2018). Modulation of innate

- immune-related genes and glucocorticoid synthesis in gnotobiotic full-sibling European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae challenged with *Vibrio anguillarum*. *Frontiers in immunology*, 9, 914.
- Román, L., Real, F., Padilla, D., El Aamri, F., Déniz, S., Grasso, V., & Acosta, F. (2013). Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with the probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish & shellfish immunology*, 35(4), 1329-1332.
- Rombout, J. H. W. M., Huttenhuis, H. B. T., Picchiotti, S., & Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 441-455.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.
- Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*, 39(3), 223-239.
- Scapigliati, G., Buonocore, F., Bird, S., Zou, J., Pelegrin, P., Falasca, C., ... & Secombes, C. J. (2001). Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 β . *Fish & Shellfish Immunology*, 11(8), 711-726.
- Secombes, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*, 15, 63-103.
- Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature immunology*, 14(4), 320-326.
- Sunyer, J. O., Tort, L., & Lambris, J. D. (1997). Structural C3 diversity in fish: characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *The Journal of Immunology*, 158(6), 2813-2821.
- Terova, G., Forchino, A., Rimoldi, S., Brambilla, F., Antonini, M., & Saroglia, M. (2009). Bio-Mos[®]: an effective inducer of dicentracin gene expression in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(4), 372-377.
- Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P. A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R. S., ... & Reinhardt, R. (2014). European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature communications*, 5(1), 1-10.
- Tort, L., Balasch, J. C., & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, 22(3), 277-286.
- Valero, Y., Arizcun, M., Cortes, J., Ramirez-Cepeda, F., Guzman, F., Mercado, L., ... & Cuesta, A. (2020). NK-lysin, dicentracin and hepcidin antimicrobial peptides in European sea bass. Ontogenetic development and modulation in juveniles by nodavirus. *Developmental & Comparative Immunology*, 103, 103516.
- Wegner, K. M. (2008). Historical and contemporary selection of teleost MHC genes: did we leave the past behind?. *Journal of Fish Biology*, 73(9), 2110-2132.

3. GLAVNI BAKTERIJSKI UZROČNICI BOLESTI U JADRANSKOM MORU

Snježana Zrnčić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

Nedavno objavljeno izvješće o kontroli bolesti u sredozemnom bazenu pokazala su da bakterijske infekcije dominiraju (75.0%) u uzgoju lubina, dok su parazitarne infekcije (57.0%) najčešće zabilježene infekcije u uzgoju komarče (Muniesa i sur. 2020). Isto izvješće je pokazalo da je vibriozna uzrokovana bakterijama roda *Vibrio* sp. najčešće izvješćivana bakterijska infekcija kod lubina u fazi rasta, a potom je slijede tenacibakuloza uzrokovana bakterijama roda *Tenacibaculum* i fotobakterioza uzrokovana bakterijom *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Vibriozna je zabilježena u svim stadijima proizvodnog ciklusa, dok tenacibakuloza i fotobakterioza predstavljaju veći problem kod mlađih kategorija ribe. To znači da su bakterijski uzročnici bolesti najčešće dijagnosticirani kao potencijalni uzročnici bolesti, s time da je lubin podložniji bakterijskim infekcijama u usporedbi s komarčom (Rigos i sur. 2021).

Ne postoje posebna izvješća o prevalenciji pojedinih bakterijskih bolesti u Jadranskom moru, međutim oba spomenuta izvješća uključuju i podatke prikupljene na farmama smještenim u Jadranskom moru te je očito da je situacija jako slična ako ne i identična kao i u ostatku Sredozemlja.

Za sve uključene u upravljanje zdravljem lubina i komarče nužno je poznavati osnovne informacije o bolestima, pa stoga ovdje dajemo kratak pregled za svaku od prethodno spomenutih bakterijskih bolesti.

Literatura:

Muniesa, A., Basurco, B., Aguilera, C., Furones, D., Reverté, C., Sanjuan-Vilaplana, A., ... & Tavoranpanich, S. (2020). Mapping the knowledge of the main diseases affecting sea bass and sea bream in Mediterranean. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3), 1089-1100.

Rigos, G., Kogiannou, D., Padrós, F., Cristofol, C., Florio, D., Fioravanti, M., & 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. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1285-1323.

3.1. Vibrioza uzrokovana bakterijom *Vibrio anguillarum*

Dražen Oraić

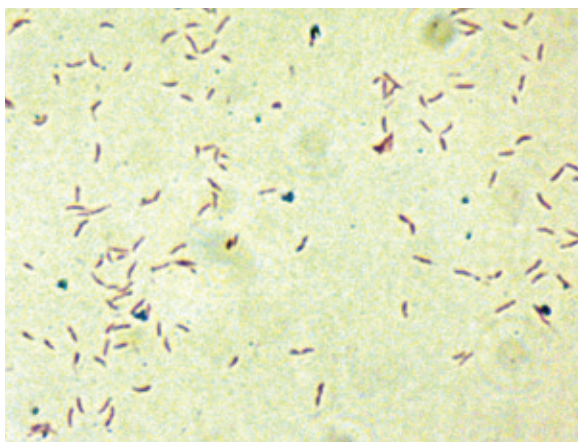
Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

3.1.1. Uzročnik

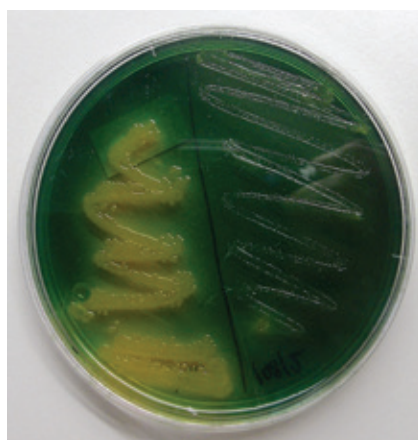
Od vibrioze uzrokovana bakterijom *Vibrio anguillarum* obolijevaju razne vrste morskih riba i riba boćatih voda te mekušci, a prvi je put opisana 1718. godine u Italiji kao „crvena kuga“, bolest jegulja u moru nakon izvješća o značajnom mortalitetu jegulja (Austin i Austin 2007). Trenutno je vibrioza uzrokovana bakterijom *V.anguillarum* globalno raširena temeljem brojnih izvješća o ovoj bolesti u više od 50 morskih i slatkovodnih vrsta riba (Toranzo i sur. 2004).

Izolirani uzročnik bolesti nazvane „*pestis rubra anguillarum*“ ili „*erysipelosis anguillarum*“ prvotno je imenovan kao *Bacillus anguillarum*. Kasnije je ista bolest uočena u jegulja iz Baltičkog mora te je izoliran isti uzročnik no predloženo je ime *Vibrio anguillarum*.

Razvojem molekularnih metoda, te temeljem rezultata sekvencioniranja, MacDonnell i Colwell (1985) su reklasificirali bakteriju u *Listonella anguillarum* te je ova bakterija službeno isključena iz porodice Vibrionaceae. Samo su tri bakterijske vrste bile klasificirane u rod *Listonella* – *L. anguillarum*, *Listonella damsela* i *Listonella pelagius* – no kasnije su ponovno premještene u rod *Vibrio* (Dikow 2011, Thompson i sur. 2011). Danas prihvaćena klasifikacija bakterije *V. anguillarum* glasi *Vibrio (Listonella) anguillarum* zbog kontroverzija oko preferencija te se i dalje publiciraju studije vezane uz ovu temu (Hickey i Lee 2018).



Slika 2. Razmaz bakterija *Vibrio anguillarum* oblika zarez a obojanih po Gramu



Slika 3. Kolonije bakterije *V. anguillarum* na TCBS agaru rastu kao žute kolonije

To je Gram-negativna štapićasta bakterija u obliku zareza, širine 0.3 - 0.5 μm i dužine 1.0 - 3.5 μm , halofilna bakterija koja ne stvara spore, fakultativni anaerob s jednolično obloženim polarnim bičevima (Actis i sur. 2011). Bakterija raste na krutom mediju koji sadrži 1.5 do 2% NaCl na temperaturi od 15 do 30 o C, formirajući kremaste kolonije okruglog oblika te žućkaste okruglaste kolonije na *Vibrio*-selektivnom tiosulfat citrat žučnom saharoza (TCBS) agaru (Slika 2), što upućuje da fermentira saharozu. Do sada je identificirano 23 različitih O serotipova (O1 -O23) ali samo serotipovi O1 i O2 te, u manjoj mjeri, O3 pokazuju patogenost prema ribljim vrstama, dok drugi serotipovi najčešće izdvojeni iz uzoraka okoliša nisu patogeni (Pedersen i sur. 1999).

3.1.2. Infekcija i ekološki faktori

Tijek infekcije bakterijom *V. anguillarum* i dalje je predmet rasprave; on počinje ingestijom zaražene hrane ili vode, bakterija preživi niski pH želuca te ulazi u crijevo gdje se prihvaća za epitel crijeva i prolifera, te konačno ulazi u krv uzrokujući septikemiju (Grisez i sur. 1996). Drugi put ulaska je penetracija bakterije kroz ozlijeđenu kožu ili oštećen mukozni sloj. Infekcija se širi horizontalno od ribe na ribu, preko hrane, vode ili kontaminirane opreme. *V. anguillarum* je uobičajen stanovnik morskog okoliša stoga može preživjeti i do 50 mjeseci u sedimentu. Bolest se najčešće javlja pri porastu temperatura mora.

Predisponirajući čimbenici za pojavu bolesti su slabo zasićenje kisikom u vodenom okolišu, slaba izmjena vode te stres zbog povećanja ili smanjenja temperature vode, visoke gustoće uzgoja, rukovanje ribom i dr. (Le Breton 1996, Frans i sur. 2011). Prisutnost teških metala, osobito bakra i željeza, pridonosi pogoršanju bolesti, a posebno visoka koncentracija i produljeno izlaganje bakru povećava prijemчивost riba na vibriozu (Austin i Austin 1993). U Jadranskom moru, tijekom ove bolesti ovisi o godišnjem dobu te su akutni i subakutni oblici bolesti češći tijekom proljeća i jeseni dok su kronični oblici češći zimi.

3.1.3. Klinički aspekti bolesti

Perakutni oblik vibrioze se općenito javlja kod mlađe ribe, najčešće bez simptoma sa smrtnošću do 80% (Frerichs i Roberts 1989). **Akutni i subakutni oblik** bolesti karakteriziran je letargijom, anoreksijom te tamnom pigmentacijom kože kao uobičajenim prvim simptomima, nakon kojih slijedi krvarenje oko usta i tjelesnih otvora, na osnovama peraja, edematoznim lezijama na koži, ulceracijom i lezijama te krvarenjem na glavi, operkulumu, s blijedim škragama i krvarenjima po škragama. Razudbom su vidljiva krvarenja po jetri i stražnjem dijelu crijeva te rjeđe u želucu. **Kronični oblik** je karakteriziran velikim granulirajućim lezijama koje prodiru duboko u mišiće te napreduju do ulceracije, teškom anemijom škrगा te sivom neprozirnom rožnicom (Haenen i sur. 2014).



Slika 4. Pigmentacija te plivanje odvojeno od ostatka jata su prvi simptomi vibrioze uzrokovane *V. anguillarum*



Slika 5. Obilna krvarenja na glavi, koži i perajama kod subakutnog oblika vibrioze uzrokovane *V. anguillarum*



Slika 6. Krvarenja po jetri, želucu i crijevu su često prisutne u akutnom subakutnom obliku vibrioze uzrokovane *V. anguillarum* u lubina



Slika 7. Kronični oblik vibrioze uzrokovane *V. anguillarum* karakteriziran granulirajućim lezijama na koži

3.1.4. Kontrola bolesti

Za zaštitu riba od vibrioze razvijeno je nekoliko komercijalnih cjepiva koja većinom sadrže oba inaktivirana serotipa O1 i O2 bakterije *V. anguillarum* (Haenen i sur. 2014). Njihova učinkovitost ovisi o načinu primjene: i) intraperitonealna primjena je najdjelotvornija no oduzima puno vremena te zahtjeva angažman velikog broja ljudi, injekcija izaziva nastanak granuloma, upale i pigmentacije; ii) cijepljenje uranjanjem se često primjenjuje unatoč kraćem trajanju imuniteta; iii) oralno cijepljenje je najmanje učinkovito radi degradacije cjepiva tijekom prolaska kroz probavni trakt.

Učinkovita metoda prevencije treba uključivati GAP (eng. *Good Aquaculture Practice*), provedbu higijenskih i mjera biosigurnosti, izbjegavanje stresa tijekom rukovanja i imunostimulaciju. Neke alternativne profilaktičke mjere, kao što je primjena probiotskih bakterijskih izolata, prebiotika, postbiotika, algi, ekstrakata kvasca ili drugih

imunostimulanata kao što su prirodni morski proizvodi (eng. *marine natural products*, MNPs) umiješano u hranu, pokazuju obećavajuće rezultate zbog poboljšavanja imunog odgovora riba (Rodrigues-Estrada i sur. 2008).

Ipak je u nekim slučajevima, primjena antimikrobnih tvari neizbježna te su rana dijagnoza i brza primjena flumekina, potenciranih sulfonamida i oksitetraciklina u hrani djelotvorni u smanjenju gubitaka. Međutim, prije primjene antibiotika preporuča se testiranje osjetljivosti izdvojenih bakterija na antibiotike (Haenen i sur. 2014).

Literatura:

- Actis, L. A., Tolmasky, M. E., & Crosa, J. H. (2011). *Vibriosis in Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections*, (Ed. 2). CABI International, Wallingford, UK. pp. 570-605.
- Austin, B., & Austin, D. A. (1993). *Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish*, (Ed. 2). Ellis Horwood, London. pp. 265-307.
- Austin, B., & Austin, D. A. (2007). *Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish*, (Ed. 4). Springer-Praxis Publishing, Ltd., United Kingdom
- Dikow, R.B. 2011. Systematic relationships within Vibrionaceae (Bacteria: Gammaproteobacteria): steps toward a phylogenetic taxonomy. *Cladistics*, 27, 9– 28.
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of fish diseases*, 34(9), 643-661.
- Frerichs, G. N., & Roberts, R. J. (1989). The bacteriology of teleosts. *Fish pathology*, 289-319.
- Grisez, L., Sorgeloos, P., & Ollevier, F. (1996). Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Diseases of aquatic organisms*, 26(3), 181-187.
- Haenen, O. L. M., Fouz Rodríguez, B., Amaro González, C., Isern, M. M., Mikkelsen, H., Zrnčić, S., & Dalsgaard, I. (2014). *Vibriosis in aquaculture*. 16th EAFP Conference, Tampere, Finland, 4th September 2013. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 2014, vol. 34, num. 4, p. 138-147*.
- Hickey, M. E., & Lee, J. L. (2018). A comprehensive review of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 585-610.
- Le Breton, A. (1996). An overview of the main infectious problems in cultured seabass *Dicentrarchus labrax* and seabream *Sparus aurata*: solutions. In *International workshop on "sea bass and sea bream culture: problems and prospects"*. *European Aquaculture Society* (pp. 67-86).
- MacDonell, M. T., & Colwell, R. R. (1985). Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and applied microbiology*, 6(2), 171-182.
- Pedersen, K., Grisez, L., Houdt, R. V., Tiainen, T., Ollevier, F., & Larsen, J. L. (1999). Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current microbiology*, 38(3), 183-189.
- Rodrigues-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., & Sweetman, J. (2008). Studies of the effects of mannan-oligosaccharides, *Enterococcus faecalis*, and poly hydrobutyric acid as immune stimulant and growth promoting ingredients in rainbow trout diets. In *5th World Fisheries Congress, Yokohama, Japan, October* (pp. 20-25).
- Thompson, F.L., C.C. Thompson, G.M. Dias, H. Naka, C. Dubay, J.H. Crosa. 2011. The genus *Listonella* MacDonell and Colwell 1986 is a later heterotypic synonym of the genus *Vibrio* Pacini 1854 (approved lists 1980) – a taxonomic opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 3023-3027.
- Toranzo, A. E. (2004). Report about fish bacterial diseases. *Mediterranean Aquaculture Laboratories, ed. Alvarez-Pellitero P, Barja JL, Basurco B, Berthe F, Toranzo AE*, 49-89.

3.2. Vibrioza uzrokovana bakterijom *Vibrio harveyi*

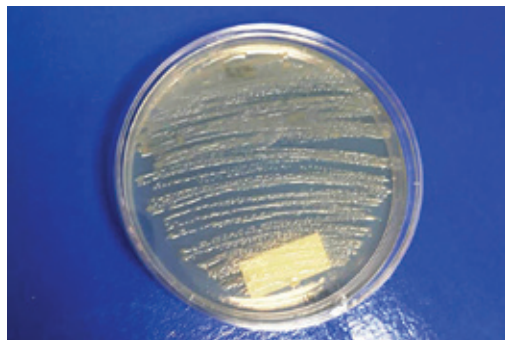
Ivana Giovanna Zupčić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

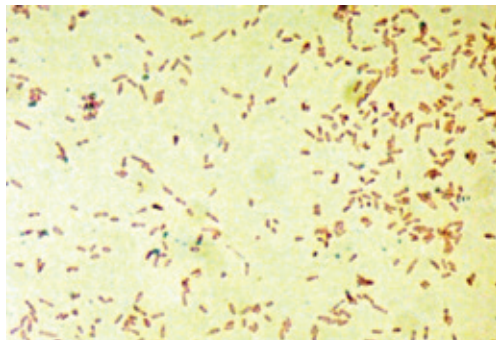
3.2.1. Uzročnik

Monofiletska skupina *Vibrio harveyi* predstavlja skupinu iznimno važnih uzročnika bolesti akvatičnih životinja s jedanaest srodnih bakterijskih vrsta: *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. mytili*, *V. natriegens*, *V. azureus*, *V. sagamiensis*, *V. owensii* i *V. jasicida* koje su fenotipski i genotipski jako homologne (Urbanczyk i sur. 2013). Sve se ove vrste bakterija uobičajeno nalaze u morskim i boćatim vodama te sedimentu (Hernández-Castro i sur. 2005).

V. harveyi je prvotno opisan kao uzročnik masovnih uginuća u mrijestilištima kozica ali je također izoliran i tijekom mnogih pojava bolesti kod različitih vrsta riba suprotropskog područja, kao što su škarpine, azijski lubin, plosnatice, „pompano“ riba te se smatra najvažnijim uzročnikom bolesti u kineskoj morskoj akvakulturi (Karunasagar i sur. 1994, Lavilla-Pitogo i sur. 1998, Qin i sur. 2006, Tendencia 2002, Pakingking i sur. 2018). U posljednjem desetljeću *V. harveyi* sve više uzrokuje ozbiljne gubitke u mediteranskoj i jadranskoj akvakulturi tijekom ljetnih mjeseci (Zupčić i sur. 2019).



Slika 8. Kolonije bakterije *Vibrio harveyi*



Slika 9. Bakterije *V. harveyi* obojane po Gramu

V. harveyi je Gram-negativna, halofilna, aerobna ili fakultativno anaerobna bakterija. Bakterija zahtijeva slične uvjete rasta kao i *V. anguillarum*. To je uvjetno patogena bakterija i nepatogeni sojevi su često dio normalne flore domaćina i okoliša ali iz okoliša su također izolirani i patogeni sojevi (Pretto 2018). U sredozemnom bazenu utvrđeno je nekoliko serotipova; tri dominantna među kojima je i novi visoko patogeni serotip utvrđen u Španjolskoj i Jadranskom moru. Međutim, neki izolati ne pripadaju nijednom od tri definirana serotipa (Amaro i sur. 2020).

3.2.2. Infekcija i ekološki faktori

Glavni faktori virulencije su bakterijski bič koji omogućava pokretljivost, litički enzimi, formiranje kapsule, siderofori koji sudjeluju u vezivanju željeza, prisutnost hidrofobnog površinskog antigena, sposobnost prijanjanja i infekcije epitelnih stanica domaćina (Wang i Leung 2000, Darshanee Ruwandepika i sur. 2012). Proizvodnja biofilma uvjetuje mehanizam razvoja antibiotske rezistencije, a sposobnost izvlačenja željeza iz stanice domaćina ključna je za njihovo preživljavanje. Intracelularni mehanizam bakterija omogućava njihovu međustaničnu komunikaciju kako bi mogle djelovati kao grupa što je od presudne važnosti za određivanje faktora virulencije (Themptander 2005). Osnova patogeneze je u kemotaksiji koja omogućava bakteriji ulazak u tkivo domaćina, tamo aktivira mehanizam vezanja željeza i proizvodi ekstracelularne toksine izazivajući simptome bolesti. Infekcija počinje u crijevu, bakterije se resorbiraju u krvotok, ulaze u organe uzrokujući generaliziranu infekciju i smrt ribe (Thompson i sur. 2004). Bolest se prenosi horizontalno s ribe na ribe.

Dokazano je da su salinitet i temperatura mora ključni za patogenost bakterije *V. harveyi*. Na jadranskom području, bolest se obično javlja tijekom ljetnih mjeseci kada su više temperature mora.

3.2.3. Klinički aspekti bolesti



Slika 10. Erozije kože na glavi i krvarenja na trupu i bazama peraja



Slika 11. Simptomi izazvani i/p infekcijom bakterijom *V.harveyi*



Slika 12. Simptomi izazvani i/p infekcijom bakterijom *V.harveyi*

Prvi simptomi bolesti su letargija i gubitak apetita, nakon čega slijedi depigmentacija, erozije kože, krvarenja na osnovi peraja, nekroze i ulceracije, blijede škrge, krvarenja po škržnom epitelu. U uznapređovalom stadiju bolesti mogu se uočiti živčani simptomi karakterizirani nekoordiniranim plivanjem zajedno s keratitisom, zamućenošću rožnice te egzoftalmijom. S obzirom da ti klinički simptomi sliče onima koji se javljaju tijekom infekcije virusom nervne nekroze (NNV) ili betanodaviroze, ovu je virusnu bolest potrebno diferencijalno isključiti iz dijagnostike. Živčani simptomi se javljaju zbog encefalne kongestije.

Kod obdukcije su u tjelesnoj šupljini prisutna krvarenja te eksudat ili ascites. Vidljiva je fokalna kongestija jetre i petehijalna krvarenja po jetri, a jedan od tipičnih simptoma je serozni do serokataralni enteritis, nekroza crijeva i lumen crijeva ispunjen bijelim do žućkastim eksudatom (Zhang i Austin 2000).

3.2.4. Kontrola bolesti

Dosada nije proizvedeno učinkovito komercijalno cjepivo, no postoji nekoliko znanstvenih radova koji opisuju obećavajuće rezultate nakon eksperimentalnih cijepljenja različitim tipovima cjepiva.

Stoga je jedina dostupna metoda kontrole bolesti dobra proizvođačka praksa (eng. Good Aquaculture Practice, GAP) i liječenje antimikrobnim tvarima, a većina jadranskih izolata je osjetljiva na oksitetraciklin, flumekin, florfenikol i potencirane sulfonamide.

Postignut je napredak u pokusnom liječenju bakteriofagima gdje je pokazana učinkovitost litičkih bakteriofaga kod račića *Artemia* inficiranih bakterijom *V. harveyi* (Misol i sur. 2020).

Literatura:

Amaro, C., Fouz, B., Sanjuan, E., Romalde, J.L. (2020). Vibriosis in *Climate Change and Infectious Fish Diseases*. (Woo, P. T. K., J. A. Leong, K. Buchmann, Eds.). CAB International, Wallingford, UK. pp. 182-210.

Hernández-Castro, R., Martínez-Chavarría, L., Díaz-Avelar, A., Romero-Osorio, A., Godínez-Reyes, C., Zavala-González, A., & Verdugo-Rodríguez, A. (2005). Aerobic bacterial flora of the nasal cavity in Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*) pups. *The Veterinary Journal*, 170(3), 359-363.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., & Karunasagar, I. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3-4), 203-209.

Lavilla-Pitogo, C. R., Leaño, E. M., & Paner, M. G. (1998). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164(1-4), 337-349.

Misol, G. N., Kokkari, C., & Katharios, P. (2020). Biological and genomic characterization of a novel jumbo bacteriophage, vB_VhaM_pir03 with broad host lytic activity against *Vibrio harveyi*. *Pathogens*, 9(12), 1051.

Pakingking Jr, R., Bautista, N. B., Catedral, 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*). *European Association of Fish Pathologists Bulletin*, 38(1), 35-41.

Pretto, T. (2018). *Vibriosis caused by Vibrio harveyi: studies on pathogenesis and vaccine efficacy in European sea bass (Dicentrarchus labrax)* (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation thesis). Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Italy.

- Yingxue, Q., Jun, W., Yongquan, S., Dexiang, W. A. N. G., & Xinzhong, C. H. E. N. (2006). Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. *Acta Oceanologica Sinica*, (1), 154-159.
- Tendencia, E. A. (2002). *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. *Aquaculture Research*, 33(6), 455-458.
- Themptander, K. 2005. *Detection and characterisation of Vibrio harveyi isolates* (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation thesis). Medical Faculty University of Upsala.
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(3), 403-431.
- Urbanczyk, H., Ogura, Y., & Hayashi, T. (2013). Taxonomic revision of Harveyi clade bacteria (family Vibrionaceae) based on analysis of whole genome sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_7), 2742-2751.
- Wang, X. H., & Leung, K. Y. (2000). Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology*, 146(4), 989-998.
- Darshane Ruwandeepika, H. A., Sanjeewa Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 59-74.
- Zhang, X. H. and B. Austin. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23, 93-102.
- Zupičić, I. G., Pavlinec, Ž., Oraić, D., & Zrnčić, S. (2019). Emerging vibriosis of Mediterranean fish caused by the bacterial species *Vibrio harveyi*: an overview. *Veterinarska stanica*, 50(5), 455-463.

3.3. Fotobakterioza uzrokovana bakterijom *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

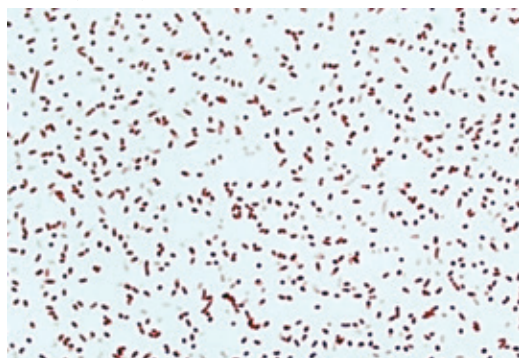
Marco Galeotti, Chiara Bulfon i Valentina Pacorig

Sveučilište u Udinama, Odjel za agrohranu, znanost o okolišu i životinjama

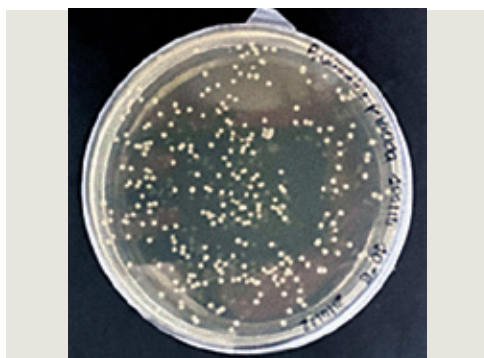
3.3.1. Uzročnik

Fotobakterioza uzrokovana bakterijom *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, prethodno zvana pastereloza ili pseudotuberkuloza je septikemijska bolest koja je prvi put zabilježena 1953. godine u SAD-u te se potom brzo proširila na Japan i Europu gdje je utvrđena 1990-tih u nekoliko zemalja sredozemnog bazena. Smatra se jednom od najvažnijih bakterijskih bolesti u marikulturi zbog globalne raširenosti i primljivosti velikog broja uzgajanih i divljih riba morskih i boćatih voda. Izaziva visoke mortalitete s posljedičnim ekonomskim gubicima, a obolijevaju gof (*Seriola quinqueradiata*), pagar (*Pagrus pagrus*), japanski pagar (*Pagrus major*), lubin (*Dicentrarchus labrax*), hama (*Argyrosomus regius*), list (*Solea spp.*), prugasti grgeč (*Morone saxatilis*), bijeli grgeč (*Morone americanus*), hibrid prugastog i bijelog grgeča (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*) i komarča (*Sparus aurata*) (Andreoni i Magnani 2014).

P. damsela subsp. *piscicida* (Phdp) je Gram negativna, halofilna, asporogena, fakultativno anaerobna bakterija iz porodice *Vibrionaceae* (Slika 12 i 13). Prvi ju je izolirao Snieszko (1964) iz bijelog grgeča (*Morone americanus*) i prugastog grgeča (*Morone saxatilis*), Jansen i Surgalla (1968) su je klasificirali i konačno su je identificirali Gauthier i sur. (1995).



Slika 13. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* razmaz obojen po Giemsi.



Slika 14. Tipične bijele i prozirne kolonije *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* izolirane iz lubina. Kolonije rastu na tripton soja agaru (TSA) ili krvnom agaru.

3.3.2. Infekcija, patogeneza i okolišni faktori

Infekcije *P. damselae* subsp. *piscicida* se prenosi horizontalno sa zaražene na zdravu ribu ili putem kontaminirane vode, hrane ili opreme. Bakterije ulaze u domaćina preko kože, škrga i crijeva, prihvaćaju se za kožu, škrge ili epitelne stanice crijeva zahvaljujući svojoj lipopolisaharidnoj (LPS) kapsuli koja olakšava adheziju kako je uočeno u crijevu lubina (Galeotti i sur. 1995 i 1996, Magariños i sur. 1996a i 1996b, Romalde 2002). Inkubacija može trajati od 48 sati do 4 dana, nakon čega se razvija septikemija i bakterija se širi cirkulacijom do različitih organa uključujući jetru, slezenu, bubreg i srce. U slezeni ju brzo fagocitiraju makrofagi i neutrofilni no ostaje živa unutar njih tijekom najmanje 7 dana zahvaljujući svojoj LPS kapsuli koja sprječava stanice da ubiju bakteriju i liziraju je. Makrofagi nose bakterije u krvi i drugim organima te ih mehanizmom Trojanskog konja štite od specifičnih i nespecifičnih imunskih obrana domaćina kao i od egzogenih antimikrobnih tvari, uključujući antibiotike (Galeotti i sur. 1995 i 1996, Romalde, 2002, Barnes i Ellis 2004, Jung i sur. 2008, Acosta i sur. 2009). U serumu bolesnih riba su uočene bakterijske embolije rezistentne na mikrobicidnu aktivnost imunskih elemenata koje putuju krvlju zajedno s makrofagima te dolaze do branhijalne cirkulacije gdje mogu blokirati kapilare primarnih lamela i uzrokovati ozbiljne ishemijske lezije i nekrotične efekte. Ovaj se patogeni mehanizam smatra glavnim uzrokom smrti od afiksije u riba inficiranih Phdp (Galeotti i sur. 1995 i 1996).

Phdp posjeduje sposobnost sposobnost izvlačenja željeza iz stanice domaćina (Magariños i sur. 1994, Jung i sur. 2007) te izlučivanje ekstracelularnih produkata (eng. Extracellular products, EPCs) s hemolitičkom, citotoksičnom i fosfolipaznom aktivnošću, koji su odgovorni za oštećenja inficiranih stanica i izlazak bakterija iz stanice te kolonizaciju susjednih stanica (Bakopoulos i sur. 2002 i 2004). Nedavno je pokazano da bakterija Phdp potiče supresiju imuniteta domaćina (Pellizzari i sur. 2013).

Bolest se razvija pri visokoj temperaturi mora (iznad 23 °C), sniženom salinitetu (20‰ - 30‰), niskoj koncentraciji kisika i lošoj kvaliteti mora (Micoli i sur. 2019).

Uočena je razlika u osjetljivosti riba na bolest ovisno o dobi ribe. Ličinke i mlade ribe su osjetljivije na infekcije i 90-100% primjeraka ugiba tijekom akutnih infekcija za razliku od onih težih od 50 jer je kod potonjih veća funkcionalnost makrofaga i neutrofila te oni mogu efikasnije fagocitirati i ubiti bakterije (Romalde 2002, Andreoni i Magnani 2014).

3.3.3. Klinički aspekti bolesti

Bolest se obično javlja u **hiperakutnom i akutnom obliku** u ličinačkom i juvenilnom stadiju. Oboljele ribe su hiperpigmentirane, letargične, plivaju neuravnoteženo i po površini, smanjeno uzimaju hranu i ubrzano dišu. Napredovanjem bolesti javlja se anoreksija, letargija, tamnjenje i ponekad erozije kože. Škrge postaju blijede, s pojačanim lučenjem sluzi i nekrotičnim područjima. Na koži se javljaju područja kongestije krvnih žila

i erozije na osnovama peraja, ustima i oko anusa. Na dnu bazena nalaze se mrtve ribe s malo ozljeda. Otvaranjem trbušne šupljine, vidljiva su difuzna krvarenja i povećana slezena s bijeličastim područjima okruglog oblika koja čine nekrotična žarišta (Slika 15, 16). Histološkom pretragom se u slezeni nalaze brojne bakterijske kolonije okružene makrofagima, te obilje acidofilnog nekrotičnog tkiva (Slika 17 i Slika 18) (Galeotti i sur. 1995 i 1996, Essam i sur. 2016), koji reagiraju jako pozitivno nakon imunohistokemije (IHC) specifičnim antitijelima (Fig. 19, 20).

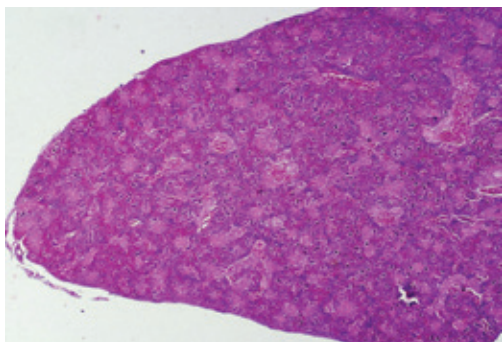
Kronični oblik bolesti uočava se kod odraslih riba kao rezultat preboljelih akutnih infekcija. Lezije se uočavaju jedino u slezeni, koja je povećana s bijeličastim čvoričima od veličine zrna prosa do nekoliko milimetara, koje ponekad konfluiraju izdižući se iznad površine organa (Slika 21), što mijenja građu organa (Slika 22).



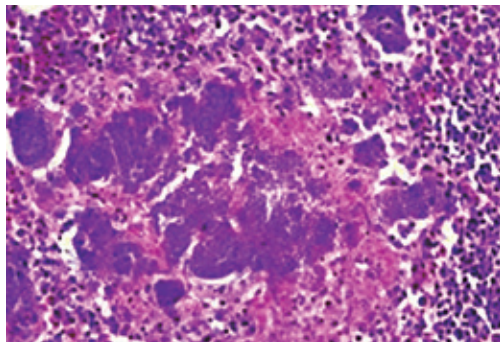
Slika 15. Juvenilni lubin pogođen akutnom fotobakteriozom uzrokovanom bakterijom Phdp: vidljive su blage difuzne hemoragije te je slezena povećana s malim bijeličastim područjima.



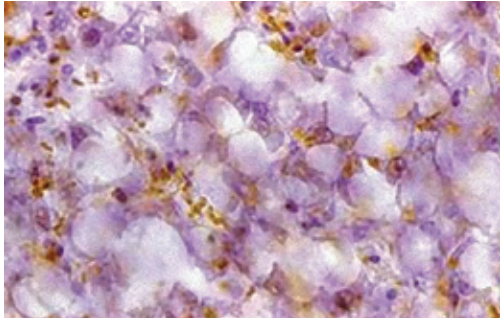
Slika 16. Povećana slezena kod juvenilnog lubina oboljelog od akutne fotobakterioze uzrokovanom bakterijom Phdp: vidljive su male točkaste lezije uzrokovane nekrotičnim žarištem



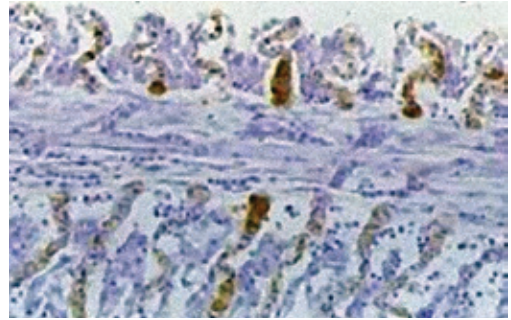
Slika 17. Histopatološka slika slezene juvenilnog lubina oboljelog od akutne fotobakterioze uzrokovanom bakterijom Phdp: prisutna su nekrotična žarišta s okolnom reakcijom i priustnost brojnih bakterijskih kolonija. H&H.



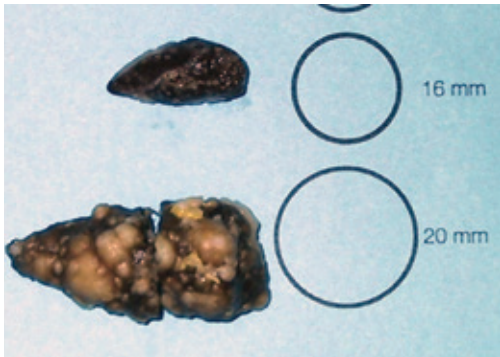
Slika 18. Detalj slike 17: vidljive su bakterijske kolonije i makrofagi, okruženi obilnim acidofilnim nekrotičnim tkivom. H&H



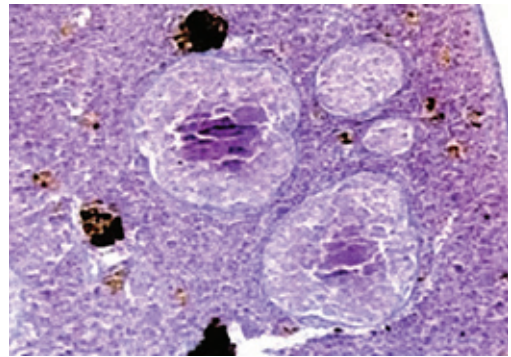
Slika 19. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* obilježena specifičnim antitijelima u jetri lubina. IHC.



Slika 20. Prisutnost bakterijske embolije i makrofaga punih bakterija, obilježenih specifičnim antitijelima unutar kapilara primarnih škržnih lamela. IHC.



Slika 21. Slezena odraslog lubina oboljelog od kronične fotobakterioze: slezenu je povećana i prekrivena čvorastim tvorevinama, bjeličastim, veličine u rasponu zrna prosa do nekoliko milimetara, ponekad konfluentnih, često se izdiže iznad površine.



Slika 22. Histološki preparat prema Slici 9: uočavaju se granulomi formirani od nekrotičnog centra okruženi makrofagima, epitelnim stanicama i fibrokonektivna reakcija. (Van Gieson Weigert trichrome bojenje).

3.3.4. Kontrola bolesti

Cijepljenje je idealna preventivna mjera za kontrolu zaraznih bolesti riba, i brojna istraživanja razvijaju učinkovita cjepiva protiv bakterije Phdp (Micoli i sur. 2019 i 2021). Varijabilnu učinkovitost pri primjeni uranjanjem i intraperitonealnom injekcijom (IP) su pokazala cjepiva koja sadrže toplinom ili formalinom inaktivirane bakterijske stanice (Magariños i sur. 1994b i 1999, Paolini i sur. 2005). Najbolje je rezultate dalo cjepivo od formalinom inaktiviranih cijelih stanica bakterije Phdp. Testirano je u lubina u monovalentnom i bivalentnom obliku (napravljeno od jednakih doza stanica bakterija Phdp i *Vibrio anguillarum*) i primijenjeno IP, oralno (mikroenkapsulirano). Primjena cjepiva IP

injekcijom rezultirala je najvećom zaštitom uz 16% mortaliteta u cijepjene ribe u odnosu na 91% u kontrolnoj grupi (Paolini i sur. 2005). Primjena cjepiva koja sadrže bakterin ili LPS-a se čini idealnom za cijepjenje matične ribe jer omogućuje prijenos određenog stupnja imunosti na ličinke kao što je dokazano u lubina. Cijepjenje ličinki od 90 dph (dana nakon valjenja) uranjanjem pruža dobru razinu zaštite. Stoga se cijepjenje matice uz cijepjenje ličinki u dobi od otprilike 90 dph predlaže kao dobra profilaktička mjera u uzgajalištima (Hanif i sur. 2004). Druga testirana bivalentna cjepiva koja sadrže Phdp i *V. alginolyticus* ili *V. anguillarum* su dala obećavajuće rezultate (Moriñigo i sur. 2002, Madonia i sur. 2017). Dokazano je da cjepiva od atenuiranih bakterija ili ekstracelularnih produkata (ECPs) primijenjena uranjanjem pružaju bolju zaštitu jer potiču aktivaciju intenzivnijeg odgovora antitijela (IgM) u škrgama i crijevnoj mukozi kao što je dokazano u lubina (Dos Santos i sur. 2001). Uranjanjem u cjepivo od mješavine inaktiviranih stanica i ECPs potiče dobru razinu zaštite u lubina stimulacijom sinteze specifičnih IgM (Bakopoulos i sur. 2003). Upotreba adjuvanata je korisna u pojačavanju učinkovitosti cjepiva jer stimuliraju jaču sintezu specifičnih antitijela nego cjepiva dana bez adjuvanata (Micoli i sur. 2021).

Uz cijepjenje, učinkovite mjere za sprječavanje bolesti su primjena odgovarajućih sanitarnih i biosigurnosnih mjera u uzgajalištima, smanjenje stresa i imunostimulacija davanjem probiotika ili algi u hrani (Couso i sur. 2003, Peixoto i sur. 2019, Abdala-Díaz i sur. 2021, Gutiérrez Falcón i sur. 2021).

U slučaju neadekvatne profilakse rana dijagnoza i primjena antimikrobnih tvari je ključna za kontrolu fotobakterioze. Pravovremeno liječenje zaraženih riba sulfa-trime-toprimom i flumekvinom je učinkovito u ograničavanju širenja bakterije dok upotreba drugih antibiotika (tetraciklini, sulfonamidi, ampicilin, klorfenikol, fluorfenikol i eritromicin) ima umjerenu do slabu učinkovitost. Upotreba drugih prirodnih tvari kao što su prirodni morski produkti (eng. marine natural products, MNPs) ili antimikrobni peptidi (eng. antimicrobial peptides, AMPs) je trenutno u eksperimentalnim fazama te čine potencijalnu buduću alternativu konvencionalnim antibioticima (Bulfon i sur. 2014).

Literatura

Abdala-Díaz, R. T., García-Márquez, J., Rico, R. M., Gómez-Pinchetti, J. L., Mancera, J. M., Figueroa, F. L., & Moriñigo, M. Á. (2021). Effects of a short pulse administration of *Ulva rigida* on innate immune response and intestinal microbiota in *Sparus aurata* juveniles. *Aquaculture Research*, 52(7), 3038-3051.

Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V., & Real, F. (2009). Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*, 32(6), 535-541.

Andreoni, F., & Magnani, M. (2014). Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *Journal of Immunology Research*, 2014.

Bakopoulos, V., Hanif, A., Poulos, K., Galeotti, M., Adams, A., & Dimitriadis, G. J. (2004). The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 27(1), 1-13.

- Bakopoulos, V., Poulos, K., Adams, A., Galeotti, M., & Dimitriadis, G. J. (2002). The effect of novel growth media on the virulence and toxicity of cellular and extracellular components of the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(4), 272-279.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A., & Dimitriadis, G. J. (2003). Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases*, 26(2), 77-90.
- Barnes, A. C., & Ellis, A. E. (2004). Bacterial Diseases of Fish—Where Do We Go from Here?. *Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases*, 1-38.
- Bulfon, C., Volpatti, D., & Galeotti, M. (2014). In vitro antibacterial activity of plant ethanolic extracts against fish pathogens. *Journal of the world aquaculture society*, 45(5), 545-557.
- Couso, N., Castro, R., Magariños, B., Obach, A., & Lamas, J. (2003). Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*, 219(1-4), 99-109.
- Dos Santos, N. M., Taverne-Thiele, J. J., Barnes, A. C., van Muiswinkel, W. B., Ellis, A. E., & Rombout, J. H. (2001). The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish & shellfish immunology*, 11(1), 65-74.
- do Vale, A., Silva, M. T., dos Santos, N. M., Nascimento, D. S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., ... & Azevedo, J. E. (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular microbiology*, 58(4), 1025-1038.
- Essam, H. M., Abdellazeq, G. S., Tayel, S. I., Torky, H. A., & Fadel, A. H. (2016). Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. *Microbial pathogenesis*, 99, 41-50.
- Galeotti, M., Bakopoulos, V., D'Angelo, L., Manetti, M.F., Musetti, M., Volpelli, L., Volpatti, D., Adams, A. (1996). Histological, immunohistochemical and ultrastructural examination of pasteurellosis experimentally induced in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In *14th Congress of the European Society of Veterinary Pathology, Ghent*, 162.
- Galeotti, M., Volpelli, L., Volpatti, D., & Del Grano, N. (1995). Pasteurellosis experimentally induced in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): histological and immunohistochemical evaluation. In *17th Congress of the European Society of Veterinary Pathology, Palma De Mallorca*, 51.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Small-Subunit rRNA Sequences and Whole DNA Relatedness Concur for the Reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the Genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(1), 139-144.
- Gutiérrez Falcón, A., Padilla, D., Real, F., Ramos Sosa, M. J., Acosta-Hernández, B., Sánchez Henao, A., ... & Martín-Barrasa, J. L. (2021). Screening of New Potential Probiotics Strains against *Photobacterium damsela* Subsp. *piscicida* for Marine Aquaculture. *Animals*, 11(7), 2029.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Leonardos, I., & Dimitriadis, G. J. (2005). The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish & shellfish immunology*, 19(4), 345-361.
- Jung, T. S., Thompson, K. D., Volpatti, D., Galeotti, M., & Adams, A. (2007). Variation in the molecular weight of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* antigens when cultured under different conditions in vitro. *Journal of Veterinary Science*, 8(3), 255-261.
- Jung, T. S., Thompson, K. D., Volpatti, D., Galeotti, M., & Adams, A. (2008). In vivo morphological and antigenic characteristics of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Veterinary Science*, 9(2), 169-175.
- Madonia, A., Melchiorri, C., Bonamano, S., Marcelli, M., Bulfon, C., Castiglione, F., ... & Romano, N. (2017). Computational modeling of immune system of the fish for a more effective vaccination in aquaculture. *Bioinformatics*, 33(19), 3065-3071.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Núñez, S., & Toranzo, A.E. (1999). Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 19, 159-161.
- Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J. L., Martínez, M. J., Congregado, F., & Toranzo, A. E. (1996a). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogenesis*, 21(4), 289-297.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Noya, M., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1996b). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 138(1), 29-34.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1994a). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2990-2998.

- Magariños, B., Romalde, J. L., Santos, Y., Casal, J. F., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1994b). Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture*, 120(3-4), 201-208.
- Miccoli, A., Manni, M., Picchiatti, S., & Scapigliati, G. (2021). State-of-the-art vaccine research for aquaculture use: The case of three economically relevant fish species. *Vaccines*, 9(2), 140.
- Miccoli, A., Saraceni, P. R., & Scapigliati, G. (2019). Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish & shellfish immunology*, 94, 800-809.
- Moriñigo, M. A., Romalde, J. L., Chabrillon, M., Magariños, B., Arijo, S., Balebona, M. C., & Toranzo, A. E. (2002). Effectiveness of a divalent vaccine for gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 22(5), 298-303.
- Paolini, A., Ridolfi, V., Zezza, D., Cocchietto, M., Musa, M., Pavone, A., ... & Giorgetti, G. (2005). Vaccination trials of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against pasteurellosis using oral, intraperitoneal and immersion methods. *Vet. Ital*, 41, 137-144.
- Pellizzari, C., Krasnov, A., Afanasyev, S., Vitulo, N., Franch, R., Pegolo, S., ... & Bargelloni, L. (2013). High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. *Fish & shellfish immunology*, 34(5), 1269-1278.
- Peixoto, M. J., Ferraz, R., Magnoni, L. J., Pereira, R., Gonçalves, J. F., Caldusch-Giner, J., ... & Ozório, R. O. (2019). Protective effects of seaweed supplemented diet on antioxidant and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) subjected to bacterial infection. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5(1), 3-9.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., & Boone, J. G. (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*, 88(6), 1814-1815.

3.4. Tenacibakuloza uzrokovana bakterijom *Tenacibaculum maritimum*

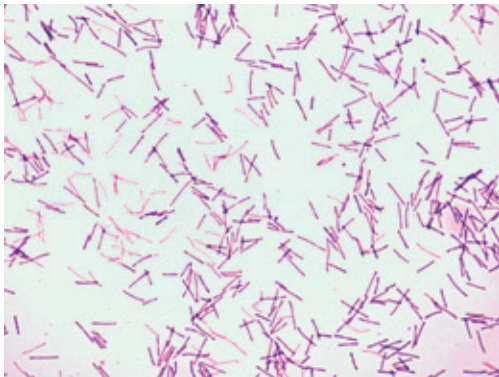
Snježana Zrnčić i Lea Vrbančić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

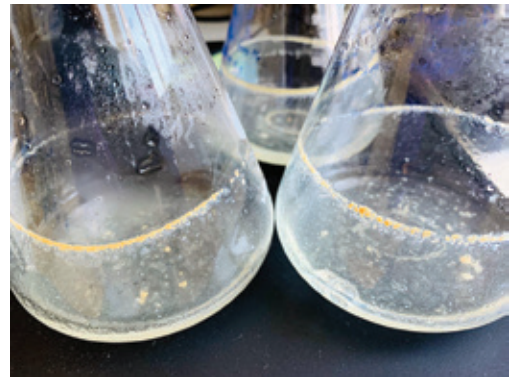
3.4.1. Uzročnik

Tenacibaculum maritimum je etiološki uzročnik ulcerativne bolesti poznate pod nazivom tenacibakuloza. Ova bolest pogađa brojne vrste morskih riba diljem svijeta (Toranzo i sur. 2015) uzrokujući znatnu ekonomsku štetu radi visokih stopa smrtnosti, povećane osjetljivosti na ostale infekcije te ogromnih troškova za liječenje (Avenidaño-Herrera i sur. 2006).

Ova je bolest prvi put zabilježena u Japanu 1977. godine kao uzrok masovnih uginuća riba vrste *Pagrus major* i *Acanthopagrus schlegeli* u mrijestilištu (Wakabayashi i sur. 1986). Iz riba pogođenih bolešću izolirana je bakterija *Flexibacter maritimus* prethodno poznata kao *Cytophaga marina*. Za analizu fenotipskih, kemotaksonomskih i filogenetskih karakteristika ove bakterije korištene su i 16S rRNA i GyrB sekvence te je prema rezultatima uzročnik bolesti reklasificiran u novi rod *Tenacibaculum* i imenovan *Tenacibaculum maritimum* (Suzuki i sur. 2001).



Slika 23. Filamentozna Gram-negativna bakterija



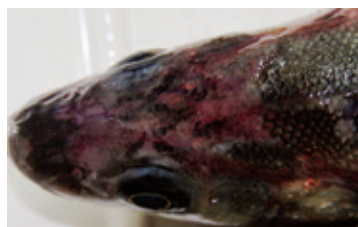
Slika 24. Stvaranje biofilma na stijenkama posude za kultiviranje

T. maritimum je Gram-negativna, filamentozna bakterija 2-30 μm dugačka i promjera 0.5 μm , a pokazuje klizajuću pokretljivost na mokrim površinama (Wakabayashi i sur. 1986). Kolonije su ravne, blijedožute s nepravilnim rubovima te snažno prijanjaju na *Flexibacter maritimus* medij (FMM), dok bakterijske stanice ne sadrže fleksirubinu sličan pigment koji se nalazi u staničnoj stijenci (Avenidaño-Herrera i sur. 2004).

3.4.2. Infekcija i ekološki faktori

Potencijalni faktori virulencije ove bakterije su snažno prijanjanje uz sluz na koži te sposobnost odupiranja njenoj baktericidnoj aktivnosti (Margarinos i sur. 1995). Ekstracelularni produkti (eng. extracellular products, ECP) ove vrste posjeduju iznimno jaku proteolitičku aktivnost koja povećava njenu patogenost. Čini se da ozbiljnost i udio prevalencije ovog uzročnika bolesti ovise o višoj temperaturi mora (iznad 15 °C), salinitetu između 30 i 35‰ i lošoj kvaliteti vode (Avendaño-Herrera i sur. 2006). Na pojavu bolesti utječe mnoštvo okolišnih uvjeta kao što su stres, UV svjetlo, manjak supstrata pijeska u spremniku, velika gustoća i loša hranidba. *T. maritimum* nije specifičan uzročnik bolesti samo za određenog domaćina, već i divlje ribe mogu služiti kao rezervoari infekcije, a neke studije aludiraju na uključenost meduza i morskih uši kao vektora u prijenosu bakterije (Ferguson i sur. 2010). Kronična prisutnost bakterije u mukuznom sloju navodi na zaključak da riblja sluz može biti rezervoar uzročnika bolesti (Avendaño-Herrera i sur. 2005).

3.4.3. Klinički aspekti bolesti



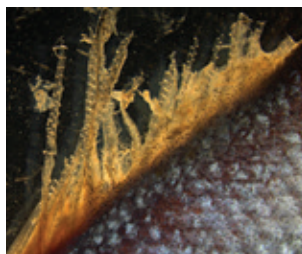
Slika 25. Karakteristične lezije na glavi lubina oboljelog od tenacibakuloze



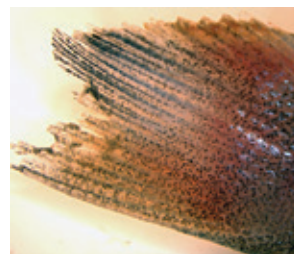
Slika 26. Lezije i krvarenja oko usta, po škržnom poklopcu i trbušnim stijenjkama lubina oboljelog od tenacibakuloze



Slika 27. Žute tvorevine na blijedim škragama lubina oboljelog od tenacibakuloze



Slika 28. "Pohabane peraje" lubina oboljelog od tenacibakuloze



Slika 29. "Truljenje repa" lubina oboljelog od tenacibakuloze

T. maritimum je uvjetno patogen uzročnik bolesti koji primarno uzrokuje opsežne lezije na koži i oštećenja škrगा, te posljedične sistemske infekcije. Zaražene ribe pokazuju gubitak apetita, uočavaju se lezije kože oko očiju i na glavi te postaju letargične. Lezije su karakterizirane povećanom produkcijom sluzi i prisutnosti bjelkastog nekrotičnog

tkiva (Småge i sur. 2016). Ribe kojima su inficirane škrge imaju povećanu brzinu disanja te su vidljive žute ili smeđe tvorevine na blijedim škragama i opsežna područja teške nekroze (Mitchell i Rodger 2011). Povećana učestalost i ozbiljnost bolesti javlja se pri temperaturama višim od 15 °C. Bolest može pogoditi sve dobne skupine no mlađe ribe razvijaju teži oblik bolesti (Tobar 2015). Bakterija posjeduje veliku sposobnost adaptacije pa se bolest može javiti pri različitim temperaturama, međutim stres, varijacije u salinitetu i imunosupresija su okidači za izbijanje bolesti.

Prema svemu prethodno opisanom, bolest ima nekoliko sinonima kao što je „izliza-
ne peraje i truljenje repa“, „nekroza škrge i očiju“, „klizajuća bakterijska bolest morskih
riba“ i „sindrom erodiranih usta“ (Toranzo i sur. 2005).

3.4.4 Kontrola bolesti

Trenutno postoji samo jedno komercijalno dostupno cjepivo, razvijeno u Španjolskoj za injekcijsko cijepljenje romba (*Scophthalmus maximus*), koje ima zadovoljavajući RPS tri mjeseca nakon cijepljenja, pružajući zaštitu do 6 mjeseci (Romalde i sur. 2005). Izvešća o eksperimentalnom cijepljenju s autolognim cjepivima pokazala su obećavajuće rezultate. U Čileu je strategija kontrole tenacibakuloze bazirana na intraperitonealnom cijepljenju i oralnom docijepljivanju kako bi se produžilo trajanje imunosti i spriječila upalna reakcija uzrokovana injekcijom.

Ipak, izbijanja bolesti trebala bi biti izbjegnuta ili smanjenja primjenom GAP kao što je kontrola gustoće riba, smanjenje stresnih uvjeta, izbjegavanje pretjeranog hranjenja i oštećenja kože uzrokovano manipulacijom. U nekim slučajevima treba se primjeniti/koristiti antimikrobni tretman ali temeljen na *in vitro* studijama osjetljivosti izoliranih bakterija. Proučavanjem različitih izolata iz različitih geografskih područja uočene su sličnosti – osjetljivost na tetraciklin, potencirane sulfonamide i florokinolone te otpornost na kanamicin, neomicin i kvinolone.

Literatura

Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of aquatic organisms*, 71(3), 255-266.

Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2004). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Diseases of aquatic organisms*, 58(1), 1-8.

Ferguson, H. W., Christian, M. D., Hay, S., Nicolson, J., Sutherland, D., & Crumlish, M. (2010). Jellyfish as vectors of bacterial disease for farmed salmon (*Salmo salar*). *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 22(3), 376-382.

Magarinos, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21(2), 103-108.

Mitchell, S. O., & Rodger, H. D. (2011). A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *Journal of fish diseases*, 34(6), 411-432.

Romalde, J. L., Ravelo, C., López-Romalde, S., Avendano-Herrera, R., Magariños, B., & Toranzo, A. E. (2005). Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture. *Developments in biologicals*, 121, 85-95.

Småge, S. B., Frisch, K., Brevik, Ø. J., Watanabe, K., & Nylund, A. (2016). First isolation, identification and characterisation of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture*, 464, 178-184.

Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., & Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(5), 1639-1652.

Tobar, J. (2015, February). Current situation of *Tenacibaculum* in Chile and potential prevention strategies. In *Tenacibaculum maritimum: Current Knowledge and Future Directions*. Workshop Report and Synopsis, Campbell River: CAHS workshop. pp. 11

Toranzo, A.E. (2015, February). Tenacibaculosis of farmed fish in Southern Europe. . In *Tenacibaculum maritimum: Current Knowledge and Future Directions*. Workshop Report and Synopsis, Campbell River: CAHS workshop. pp. 8

Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1-4), 37-61.

Wakabayashi, H., Hikida, M., & Masumura, K. (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(3), 396-398.

4. CIJEPLJENJE I STRATEGIJA CIJEPLJENJA

Snježana Zrnčić i Dražen Oraić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

4.1. Uvod

Cijepljenje je ključna komponenta za održivu proizvodnju zdravih uzgojenih riba (Miccoli i sur. 2019) i mora biti prepoznato kao glavni put prema smanjenju upotrebe antibiotika u industriji akvakulture (Adams 2019).

S ekonomskog aspekta, cijepljenje je najbolja metoda povećanja udjela preživljavanja i profitabilnosti akvakulture u kombinaciji s ostalim metodama nužnim za postizanje optimalnog rasta i preživljavanja; nabavka mlađi visoke kvalitete, dobra i kvalitetna ishrana, dobra proizvođačka praksa i kvalitetno upravljanje zdravljem (McLoughlin 2016). Osim povećanja udjela preživljavanja zbog kontrole značajnih bolesti, cijepljenje sprječava širenje bolesti unutar farme i na druge farme, smanjuje troškove proizvodnje, smanjuje potrebu za korištenjem antibiotika i kemikalija te posljedično smanjuje probleme vezane uz antimikrobnu rezistenciju, ali i zabrinutost oko rezidua antibiotika u ribi za ljudsku prehranu i štetnog utjecaja na okoliš (Adams 2016).

Cilj cijepljenja je potaknuti nastanak dugotrajne imunosti prema jednom ili više uzročnika bolesti poticanjem specifičnog imunskog sustava te zaštitu od jedne ili više bolesti. Dobro cjepivo treba imati nekoliko važnih karakteristika: i) treba biti sigurno i netoksično, ii) isplativo, iii) treba osigurati dugotrajnu zaštitu, iv) učinkovitost cijepljenja ovisi o vremenu kada se provodi cijepljenje sa ciljem zaštite riba u određenoj dobi ili prije vremenskog razdoblja kada su najosjetljivije na bolesti, v) način primjene cjepiva treba prilagoditi starosti ribe i samom cjepivu.

4.1.1. Vrste cjepiva

Postoji nekoliko tipova cjepiva (Ma i sur. 2019):

- 1) Inaktivirana cjelovita cjepiva su cjepiva napravljena od uzročnika bolesti inaktiviranih različitim metodama, a mogu biti nadopunjena adjuvantima
- 2) Živa oslabljena cjepiva su modificirana cjepiva napravljena od živih uzročnika bolesti s oslabljenom virulencijom ili prirodno niskom virulencijom za ciljane riblje vrste ili uzročnici bolesti mogu biti oslabljeni fizikalnim ili kemijskim procedurama, kultivacijom pod nenormalnim uvjetima ili genetskom manipulacijom
- 3) Subjedinična cjepiva su cjepiva napravljena korištenjem samo antigenskih komponenta uzročnika bolesti i kod njih ne postoji rizik od patogenosti prema domaćinu

ili neciljnim vrstama s obzirom da se ne mogu umnožavati u domaćinu (Hanson i sur. 2000)

- 4) Rekombinantna cjepiva se proizvode pomoću tehnologije rekombinantne DNA. Proizvodnja uključuje nekoliko koraka: umetanje dijela DNA koji kodira za antigen koji će stimulirati imunosni odgovor u bakterijske ili stanice sisavaca, ekspresija antigena u njima, pročišćavanje antigena te konačno njegovo korištenje za imunizaciju (Lorenzen 1999)
- 5) Cjepiva nukleinskih kiselina (DNA ili RNA) sastoje se od DNA ili RNA koja kodira za antigen(e) od interesa. Ova se cjepiva relativno lako kreiraju te su sigurna za primjenu jer se ne mogu vratiti u patogeno stanje (Ulmer i sur. 2012)
- 6) Sintetska cjepiva se većinom ili potpuno sastoje od sintetskih peptida, ugljikohidrata ili antigena (Adams 2019)

Trenutno je većina komercijalno dostupnih cjepiva napravljena od cijelih uzročnika bolesti inaktiviranih toplinom ili formaldehidom. U slučaju bakterija, to znači da cjepiva sadrže patogene bakterijske stanice i njihove ekstracelularne produkte koji su dio infektivnog mehanizma. Bakterije su uzgojene u mediju i potom deaktivirane. Cjepiva se mogu primjenjivati s adjuvantima ili bez njih, a cjepiva koja se primjenjuju intraperitonealno najčešće se daju s adjuvantima.

Adjuvanti su farmakološke ili imunološke tvari sposobne modificirati djelovanje drugih tvari, kao što su lijekovi ili cjepiva. Kada su dani zajedno sa cjepivom, adjuvanti stimuliraju imunosni sustav i pojačavaju njegov odgovor na cjepivo. Aluminijska sol, virosomi i određena ulja se uobičajeno koriste kao adjuvanti za cjepiva.

Cjepiva mogu biti monovalentna ili polivalentna. Monovalentna cjepiva imaju sposobnost štiti ribu od jednog mikroorganizma dok polivalentna cjepiva mogu imunizirati protiv dva ili više različitih mikroorganizama. Općenito, čini se da monovalentna cjepiva potiču jači imunosni odgovor.

4.1.2. Primjena cjepiva

Postoje tri metode primjene cjepiva:

- 1) Cijepljenje injekcijom – injekcija može biti intraperitonealna ili intramuskularna. Ova metoda cijepljenja zahtjeva puno vremena, dodatnu opremu i izvježbane operatere, radno intenzivna i vrijeme potrebno za cijepljenje jednog kaveza je duže u usporedbi sa cijepljenjem uranjanjem. Tijekom primjene cjepiva injekcijom, riba bi trebala biti anestetizirana i odgovarajuće veličine. Međutim, trajanje imunosti postignute ovim načinom primjene cjepiva je duže nego trajanje imunosti izazvano nakon cijepljenja uranjanjem.
- 2) Cijepljenje uranjanjem ili cijepljenje kupkom je metoda od izbora za mrijestilišta i ribe male veličine. Ova metoda podrazumijeva uranjanje skupine riba tijekom točno

određenog vremenskog razdoblja u mješavinu cjepiva i mora u kojem se riba uzgaja. Prednosti ove metode cijepjenja su što se velik broj riba može cijepiti u isto vrijeme te ne zahtjeva dodatnu opremu osim one koja se uobičajeno koristi na uzgajalištima. Količina cjepiva potrebna za jedan kavez riba je veća a imunost dobivena cijepljenjem uranjanjem traje kraće u usporedbi s cijepljenjem injekcijom.

- 3) Oralno cijepljenje je metoda davanja cjepiva putem hrane. To je najjednostavnija metoda cijepjenja, nije štetna za ribe i ne zahtjeva nikakvu opremu ni posebne vještine operatera. Glavni nedostatak ove metode je što oralno cijepljenje ne pobuđuje niti snažan niti dugotrajan imunitet. Kako bi se izazvala učinkovita zaštita potrebno je dati višu dozu antigena u usporedbi s injekcijskim i cijepljenjem uranjanjem. Slab imunostni uzrokovan je zbog niske pH i visoke enzimske aktivnosti u prednjem dijelu crijeva riba koji degradiraju cjepivo. Microenkapsulacija cjepiva zaobilazi ove prepreke no i dalje imunostni odgovor cijepljenih riba ovom metodom nije tako dobar kao onaj nakon primjene cjepiva injekcijom.

Optimalni rezultati cjepiva ne ovise isključivo o odabiru tipa cjepiva i metode njegove primjene već također i o vrsti ribe koja se cijepi, stanju njihovog imunostnog sustava, ciklusu proizvodnje i epidemiološkoj situaciji bolesti koje želimo kontrolirati, kada se te bolesti pojavljuju, tehnologiji uzgoja, uvjetima okoliša (temperatura, salinitet), faktori- ma stresa, prehrani i studiji isplativosti.

Treba podignuti svijest o činjenici da cjepivo neće biti učinkovito protiv bolesti koje trenutno traju ali će biti korisne u sprječavanju izbijanja određenih bolesti. Također, uzgajivači moraju biti svjesni da će cijepljenjem njihove ribe biti zaštićene od određenih bolesti ali ne od svih bolesti.

Literatura

Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & shellfish immunology*, 90, 210-214.

Hansson, M., Nygren, P. A. K., & Stahl, S. (2000). Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnology and applied biochemistry*, 32(2), 95-107. Lorenzen N. 1999. Recombinant vaccines: experimental and applied aspects. *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 361-365

Ma, J., & Bruce, J. T., M. Jones, E. y D. Cain, K. A (2019). Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms*, 7, 569.. doi:10.3390/microorganisms7110569.

McLoughlin, M (2016). Fish Vaccination - A brief overview, Aquatic Veterinary Services Belfast. https://kipdf.com/fish-vaccination-a-brief-overview-dr-marian-mcloughlin-aquatic-veterinary-servic_5ad31cda7f8b9aa8988b459a.html (accessed online 5th February 2022) Miccoli, A., Saraceni, P. R., & Scapigliati, G. (2019). Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish & shellfish immunology*, 94, 800-809.

Ribeiro, C., & Schijns, V. E. (2010). Immunology of vaccine adjuvants. In *Vaccine adjuvants* (pp. 1-14). Humana Press, Totowa, NJ.

Ulmer, J. B., Mason, P. W., Geall, A., & Mandl, C. W. (2012). RNA-based vaccines. *Vaccine*, 30(30), 4414-4418.

4.2. Popis dostupnih komercijalnih cjepiva

Komercijalna cjepiva za upotrebu u uzgoju lubina i komarče

Ime proizvoda	Proizvođač	Aktivna tvar	Način primjene	Doza	Registrirano		
					Hrvatska	Italija	Centralno EU
AlphaDip Vib	Pharmaq Zoetis	Inaktivirana bakterija <i>Vibrio anguillarum</i>	Uranjanje*	1:20	da	da	ne
AlphaJect 2000	Pharmaq Zoetis	Inaktivirane bakterije <i>V.anguillarum</i> , <i>Photobacterium damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>	Injeksija	0.1 mL	da	ne	da
AlphaJect micro 2000	Pharmaq Zoetis	Inaktivirane bakterije <i>V.anguillarum</i> , <i>Photobacterium damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>	Injeksija	0.05 mL	da	da	da
AlphaJect micro Noda	Pharmaq Zoetis	Inaktiviran virus NNV genotip RGNNV	Injeksija	0.05 mL	da	da	da
Icthiovac VNN	LABORATORIS HIPRA	Inaktiviran noda virus	Injeksija	0.1 mL	da	da	da
Icthiovac VR	LABORATORIS HIPRA	Inaktivirana bakterija <i>Vibrio anguillarum</i>	Kupka* 10s Kupka* 1 h	1:10 1:500	ne	da	da
Icthiovac VR/PD	LABORATORIS HIPRA	Inaktivirana bakterija <i>V.anguillarum</i> , <i>Ph.damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>	Injeksija	0.1 mL	da	da	da
Icthiovac PD	LABORATORIS HIPRA	Inaktivirana bakterija <i>Ph.damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>	Kupka* 10s Kupka* 1 h	1:10 1:500	da	da	da
MARIMARK	Benchmark Animal Health	Inaktiviran virus NNV genotip RGNNV	Injeksija	0.1 mL	da	ne	ne
VIBRIFISH VAX	FATRO	Inaktivirana bakterija <i>Vibrio anguillarum</i>	Imerzija*	1:10	ne	da	ne
VIBRIFISH VAX	FATRO	Inaktivirana bakterija <i>Vibrio anguillarum</i>	Injeksija	0.1 mL	ne	da	ne
AQUAVAC VIBRIO IMMERSION	MSD ANIMAL HEALTH	Inaktivirana bakterija <i>Vibrio anguillarum</i>	Imerzija*	1:10	ne	da	da

*Razlika između uranjanja, kupke i imerzije u ovoj tablicu nisu definirane nego smo koristili terminologiju koju su koristili proizvođači u uputama o uporabi pojedinog cjepiva. Stoga preporučamo pažljivo proučiti upute za uporabu i detaljno ih slijediti tijekom primjene pojedinog cjepiva.

Izvori:

Ministry of agriculture. Veterinary and Food Safety Directorate. 2022. <http://veterinarstvo.hr/default.aspx?id=140>.
Pristupljeno 21. siječnja 2022.

Ministero della Salute. Prontuario dei medicinali veterinary versione 1.2.0. 2022. https://www.vetinfo.it/j6_prontuario/public/

<https://www.ema.europa.eu>

4.3. Cijepljenje u mrijestilištima

Dražen Oraić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

Danijel Mejdandžić

Cromaris, d.d.

Poznato je da tek izvaljene morske ribe nemaju sposobnost stvaranja antitijela do nekoliko tjedana života, no imaju razvijenu urođenu imunost širokih sposobnosti i mehanizama zaštite od uzročnika bolesti (Galindo-Villegas i Mulero 2014).

U mrijestilištima lubina i komarče, prvo cijepljenje se odvija kada ribe dosegnu težinu od 1g ili više. Pri toj veličini, cjepiva se primjenjuju kupkom te, radi nepotpuno razvijenog imunosnog sustava, imunitet ne traje dulje od 4 do 6 mjeseci. Iz tog je razloga potrebno docijepljivanje većih riba te se za docijepljivanje najčešće primjenjuju intraperitonealne injekcije.

U ovom ćemo poglavlju pokušati navesti sve korake potrebne za provedbu uspješnog cijepljenja u mrijestilištima lubina i komarče.

Najviše treba imati na umu da će samo zdrava riba razviti optimalnu imunost zaštitu.

A. Tjedan dana prije planiranog cijepljenja potrebno je proći kroz pojedine važne stavke:

1. Prije planiranog cijepljenja potrebno je napraviti detaljan zdravstveni pregled uključujući ponašanje riba, apetit i mortalitet.
2. Ako se dijagnosticira neka bolest, ribu je potrebno izliječiti prije planiranog cijepljenja.
3. Iako nije nužno, ishod cijepljenja biti će bolji ako se neki od komercijalno dostupnih imunostimulanata dodaje u hranu tjedan ili dva prije cijepljenja.
4. Riba mora biti odgovarajuće veličine za cijepljenje.
5. Potrebno je procijeniti količinu/broj riba za cijepljenje te provjeriti je li dostupna dovoljna količina cjepiva te je li cjepivo pravilno skladišteno pri 2-8 °C, da nije smrznuto te da je zaštićeno od svjetlosti.
6. Potrebno je provjeriti kvalitetu cjepiva te rok trajanja.

B. Dan ili dva prije cijepljenja treba pregledati dodatne stavke:

1. Sva oprema koja će se koristiti za cijepljenje ili koja će doći u kontakt s ribama mora biti temeljito oprana i dezinficirana.

2. Bazeni u kojima će riba biti smještena nakon cijepljenja također moraju biti očišćeni i dezinficirani.
3. Zajedno s obučanim osobljem treba napraviti plan cijepljenja u kojem svaka osoba zna što će raditi i u kom trenutku.
4. Potrebno je odrediti prosječnu tjelesnu težinu ribe težinu koja će se cijepiti (preporučena veličina ribe je 1 do 5 grama)
5. Riba mora gladovati dan prije cijepljenja.

C. Postupak cijepljenja

1. Izvaditi bocu cjepiva iz frižidera i ostaviti vani kako bi poprimila temperaturu okoliša, sadržaj boce dobro promućkati kako bi bili sigurni da je sadržaj jednoliko promiješan/homogen
2. Odmah nakon otvaranja razrijediti sadržaj boce s vodom mrijestilišta prema uputama za uporabu dobivenih od proizvođača te dobro promiješati
3. Izbjegavati miješanje cjepiva s drugim proizvodima
4. Ribu cijepiti u skupinama, izvagati ribu za cijepljenje kako bi bili svjesni količine i volumena ribe (Slika 30)



Slika 30. Količina mlađa za cijepljenje uranjanjem



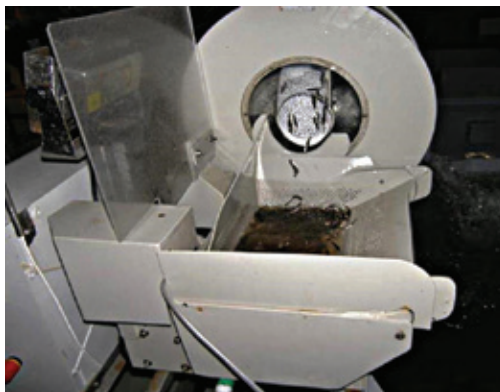
Slika 31. Cijepljenje mlađa uranjanjem u cjepivo



Slika 32. Vaganje cijepljene ribe

5. Držati mlađ uronjen u cjepivo prema uputama proizvođača cjepiva od 30 do 60 sekundi ili čak duže za neka cjepiva (Slika 31, 32)
6. Pokušati spriječiti dodatno razrijeđivanje cjepiva pri stavljanju skupine riba u posudu za cijepljenje
7. Nakon cijepljenja odmah premjestiti skupinu riba u novi čisti bazen
8. Osigurati da osoblje uključeno u cijepljenje nosi odgovarajuću zaštitu kao što su gumene rukavice i zaštitne naočale

9. Neškodljivo ukloniti sve prazne boce u kojima je bilo cjepivo kao i iskorišteno cjepivo prema uputama proizvođača
10. Velika mrijestilišta mogu koristiti strojeve za cijepljenje uranjanjem (Slike 33 i 34)



Slika 33 i 34. Strojno cijepljenje uranjanjem u mrijestilištu

D. Nakon cijepjenja

1. Pozorno pratiti ponašanje cijepljenih riba i polako ih početi ponovno hraniti slijedeći dan
2. Imunitet se počinje razvijati za 2 tjedna pri $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ i traje oko 10 tjedana pri istoj temperaturi
3. Ribe trebaju biti cijepjene barem 2 tjedna prije premještanja iz mrijestilišta u kaveze

Literatura

Galindo-Villegas, J., & Mulero, V. (2015). Current knowledge on the development and functionality of immune responses in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of European sea bass*, 342-373.

RUMA (Responsible Use of Medicines in Aquaculture Alliance) (2006). Responsible use of vaccines and vaccination in fish production. Available at: www.ruma.org.uk

4.4. Docjepljivanje na uzgajalištima

Snježana Zrnčić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

Imunitet postignut cijepljenjem u mrijestilištu traje oko 10 tjedana pa kako bi se zaštitile mlade ribe u osjetljivoj dobi tijekom uzgoja u kavezima docjepljivanje je neizbježno. U suprotnom, uzgajivači će se suočiti s gubicima uzrokovanim bakterijskim uzročnicima bolesti opisanim u prvom poglavlju ovog dokumenta. Primjenom antibakterijskih lijekova mogu se smanjiti gubici no često bolest nije uočljiva u prodromalnom stadiju (stadiju kada je riba zaražena ali još ne pokazuje kliničke simptome) stoga su rezultati liječenja upitni (Rigos i sur. 2021). Kada uzgajivači primijete promjene u uzimanju hrane, ponašanju ili povišene mortalitete najčešće u suradnji sa stručnjacima za bolesti riba započine dijagnostički postupak koje se sastoji od uzorkovanja, potom slijedi razudba, uzimanje tkiva za daljnje pretrage, bakteriološka pretraga sa ciljem izdvajanja uzročnika bolesti, testiranje osjetljivosti izdvojenih bakterija na antibakterijske lijekove, narudžba ljekovite hrane ili kupnja antibiotika i priprema ljekovite hrane pod veterinarskom kontrolom. Cijeli ovaj postupak traje predugo, minimalno pet do sedam dana, i liječenje obično započine prekasno, kada su gubici već vrlo značajni (Zrnčić 2020). Liječenje bakterijskih bolesti u akvakulturi je uobičajeno metaflaklično, što znači da je liječenje usmjereno na liječenje bolesnih životinja dok se istovremeno daju lijekovi drugim životinja u grupi kako bi se spriječila bolest (FAO/WHO/OIE 2003). Upotreba antibakterijskih lijekova smanjuje gubitke no opetovana upotreba istih supstanci dovodi do razvoja antimikrobne rezistencije, taloženja rezidua antimikrobnih tvari u tkivu ribe i morskom okolišu (Smith 2012).

Kako bi se izbjegle sve ove neželjene i loše posljedice za profitabilnost akvakulture, kvalitetu konačnog proizvoda i zdravlje potrošača i okoliš, jedna od glavnih i preporučljivih metoda kontrole širenja zaraznih bolesti na uzgajalištu je docjepljivanje ribe koja je prije transfera u kaveze cijepljena u mrijestilištu.

Isto kao i u slučaju cijepjenje u mrijestilištima, potrebno je naglasiti da će samo zdrava riba nakon cijepjenja razviti optimalni imunitet.

Stoga treba naglasiti da sve potrebne pripreme trebaju početi dva tjedna prije planiranog docjepljivanja:

1. Potrebno je provesti detaljan zdravstveni pregled jer procedura cijepjenja može potaknuti infekciju u prodromnoj fazi i uzrokovati visok mortalitet. Ako je otkrivena bilo kakva bolest (bakterijska ili parazitarna), riba planirana za cijepljenje mora se najprije izliječiti.

2. Nije obavezno, ali će rezultati cijepljenja biti bolji ako riba bude tretirana imunostimulantima dodanima u hranu tijekom određenog razdoblja prije cijepljenja.
3. Prije cijepljenja riba mora gladovati, a vrijeme gladovanja ovisi o temperaturi mora i veličini ribe. Ako je temperatura mora viša i riba manja, gladovanje može trajati 24 sata ali u slučaju većih riba i nižih temperatura trebalo bi trajati dulje. Gladovanje je važno jer riba s praznim probavnim traktom bolje podnosi rukovanje i bolje reagira na anestetike.
4. Optimalna temperatura za cijepljenje je 17-22°C. Potrebno je izbjegavati cijepljenje tijekom razdoblja promjena temperature mora ili kada je temperatura mora viša od 24°C.

4.4.1. Docjepljivanje uranjanjem

Snježana Zrnčić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

Igor Cvitić

Friškina d.o.o

A. Dan prije cijepljenja

1. Sva oprema potrebna za cijepljenje uranjanjem mora biti očišćena i dezinficirana (cerada, plastične posude za uranjanje, vaga, mrežice za hvatanje ribe, boce s kisikom, oksimeter itd.)
2. Potrebno je pripremiti kavez s čistom mrežom za prihvat cijepljenih riba
3. Potrebno je procijeniti količinu (biomasu) ribe koja će se cijepiti kako bi se pripremila dovoljna količina cjepiva
4. U dogovoru s obučanim osobljem treba napraviti plan cijepljenja u kojem svaka osoba zna kada će i što raditi.

B. Na dan cijepljenja

1. Izvaditi bocu cjepiva iz frižidera i ostaviti vani kako bi poprimila temperaturu okoliša/vanjsku temperaturu, sadržaj boce dobro promućkati kako bi bili sigurni da je sadržaj jednoliko promiješan i odmah nakon otvaranja razrijediti sadržaj boce s vodom uzgajališta prema uputama za korištenje dobivenih od proizvođača te dobro promiješati (Slika 35)



Slika 35. Posuda s odgovarajuće razrijeđenim cjevivom za docjepljivanje uranjanjem

2. Osigurati da osoblje uključeno u cijepljenje nosi odgovarajuću zaštitu kao što su gumene rukavice i zaštitne naočale
3. Mrežu kaveza s ribama koje će se cijepiti treba skratiti na pola kako bi ribe koje će se cijepiti bile zgusnute (Slika 36)



Slika 36. Skraćivanje mreža u kavezu koji će se docjepljivati

4. Oko mreže treba staviti ceradu te omogućiti opskrbu kisikom iz boce (Slika 37). Potrebno je kontinuirano kontrolirati zasićenje kisikom i u slučaju pada koncentracije, kisik se mora dodati u vodu (Slika 38).

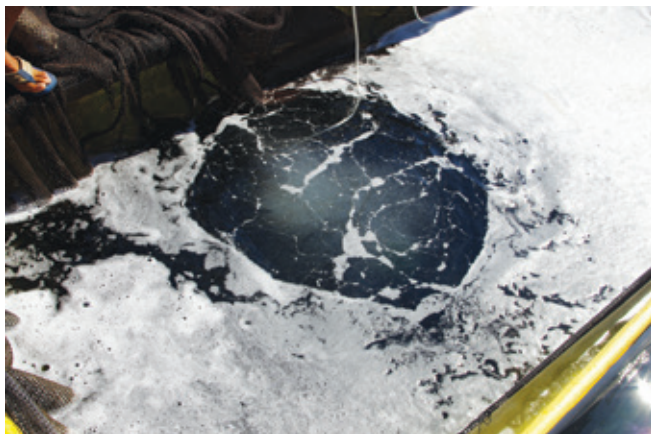


Slika 37. Namještanje cerade oko kaveza s ribom koja će se cijepiti



Slika 38. Kontrola zasićenosti kisikom u kavezu oko kojeg je postavljena cerada

5. Ribu u ceradi treba blago sedatirati niskim dozama anestetika



Slika 39. Blago sedirana riba u ceradi

6. Potrebno je pripremiti otopinu cjepiva u vodi uzgajališta i najčešće razrjeđenje je 1:10 (jedna litra cjepiva i 9 litara vode uzgajališta) no to ovisi o proizvođaču cjepiva. U nekim slučajevima radi se o koncentriranom cjevivu gdje je omjer razrjeđenja 1:20. Jedna litra cjepiva je dovoljna za cijepljenje 100 kg ribe iznad 5 grama
7. Skupine riba do ukupne težine do 0.5 kg trebaju se vaditi mrežicom iz cerade, voda u kojoj se drži riba mora biti ocijeđena kako bi se spriječilo dodatno razrjeđivanje cjepiva, riba se treba uroniti u razrjeđenje cjepiva i držati u njemu 30 sekundi



Slika 40. Uranjanje u cjevivo

8. Nakon uranjanja u cjevivo (Slika 40), skupina riba se treba izvagati i količina zabilježiti (Slika 41) kako bi se izbjeglo uranjanje veće količine riba u pripremljenu količinu nego što je dopušteno (u trenutku kada ukupna količina uronjene ribe dosegne dozvoljenu količinu za cijepljenje potrebno je napraviti pauzu i pripremiti novu otopinu cjepiva)



Slika 41. Vaganje cijepljene riba

9. Nakon vaganja cijepljena riba se mora odmah lagano otpustiti u novi kavez sa čistim mrežama (Slika 42)



Slika 42. Smještanje cijepljene ribe u novi kavez

10. Iskorišteno cjepivo treba se neškodljivo zbrinuti prema uputama proizvođača

C. Nakon cijepjenja

1. Ponašanje cijepljene ribe se mora pažljivo promatrati i polako je početi ponovno hraniti slijedeći dan

4.4.2. Docijepljivanje injekcijom

Dražen Oraić

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba

Danijel Mejdandžić

Cromaris, d.d.

Priprema ribe je gotovo potpuno ista kao i za docijepljivanje uranjanjem međutim **u slučaju docijepljivanja injekcijom potrebne su dodatne pripreme kao što slijedi:**

1. Prije cijepjenja mora se procijeniti količina ribe jer propisno procijenjena količina ribe povećava brzinu i točnost cijepjenja
2. Riba manja od 15 g nije primjerena za cijepjenje injekcijom
3. Riba mora gladovati 24 sata prije cijepjenja pri temperaturama mora višim od 19°C ili 3 dana ako je temperatura niža od 18°C. To je izrazito važno jer rastegnuta crijeva prilikom cijepjenja mogu dovesti do injekcije cjevica u probavni sustav
4. Cjepivo se mora čuvati pri temperaturi od 4-8°C

A. Dan prije cijepjenja

1. Sva oprema potrebna za injekcijsko cijepjenje koja bi mogla doći u kontakt s ribama mora biti očišćena i dezinficirana (cerada, mrežice, stolovi za cijepjenje, cijevi, pumpe, automatizirane šprice, dovoljan broj igli, posude za anesteziju itd.) kao što je vidljivo na slici 43.



Slika 43. Priprema opreme potrebne za docijepljivanje injekcijom

2. Obučeni tehničar mora pripremiti i upravljati uređajem za cijepjenje ako će se isti koristiti

3. Potrebno je pripremiti kavez s čistom mrežom za prihvaćanje cijepljenih riba
4. Potrebno je procijeniti količinu (biomasu) ribe koja će se cijepiti kako bi se pripremila dovoljna količina cjepiva
5. Potrebno je pripremiti dovoljnu količinu odobrenog anestetika
6. Zajedno s obučanim osobljem treba napraviti plan cijepjenja u kojem svaka osoba zna što će raditi i kada
7. Injekcijski uređaja mora biti kalibriran svaki put prije cijepjenja (Slika 44)



Slika 44. Kalibriran injekcijski uređaj

8. Potrebno je odrediti odgovarajuću veličinu (dužinu) igle prema veličini ribe, debljini trbušne stijenke i mjestu davanja injekcije. Uobičajeno se koriste igle dugačke 3 mm za ribe od 25-40 g; 4 mm za ribe od 40-80 g i 5 mm za one koje teže više od 80 g. Promjer igle je 0.6 mm
9. Osoblje treba biti upoznato sa sigurnosnim postupcima i uputama u slučaju da se ubodu injekcijom. Ako tim nije opremljen auto-injektorima adrenalina, liječnik mora biti lako dostupan

B. Na dan cijepjenja

1. Provjeriti cjepivo prije korištenja; treba izgledati homogeno nakon mućkanja boce (Slika 45)
2. Cjepivo treba izvaditi iz frižidera kako bi se doseglo temperaturu između 15 i 20°C jer je tada lakše s njime raditi. Cjepivo mora biti zaštićeno od visokih temperatura i direktne svjetlosti



Slika 45. Homogeni izgled prije cijepljenja

3. Riba trebaju biti skupljene u grupu skraćivanjem mreža i stavljanjem cerade te umirene niskim dozama anestetika (Slika 46). Cerada mora imati kontinuiran dotok kisika (Slika 47)



Slika 46. Skraćivanje mreže i stavljanje cerade



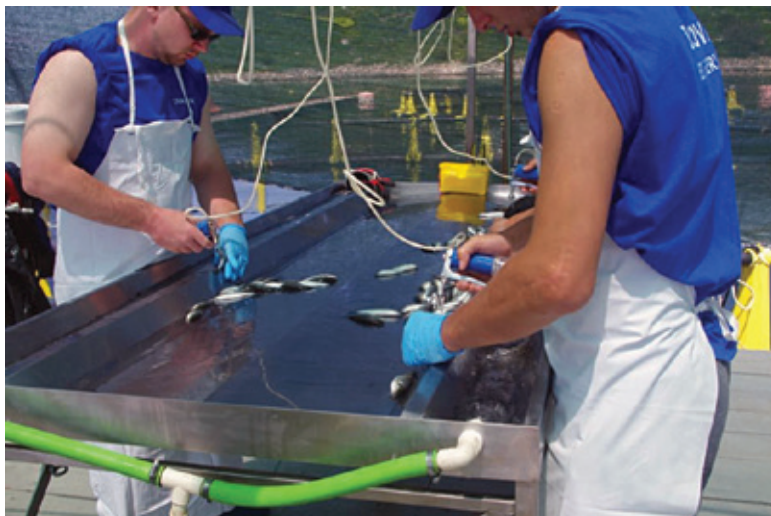
Slika 47. Kontinuirana opskrba kisikom i vađenje potrebnih količina mlađa za docjepljivanje

4. Potrebno je pripremiti posude s anestetikom, izvaditi male skupine riba iz cerade i potom ih uroniti u anestetik tijekom 40 do 120 sekundi
5. Otopina anestetika se mora mijenjati prema uputama proizvođača
6. Potrebno je anestetizirati odgovarajući broj riba kako bi ih se sve stiglo cijepiti unutar 3 minute. Riba moraju biti anestezirane tijekom cijepljenja inače će gubici biti veliki



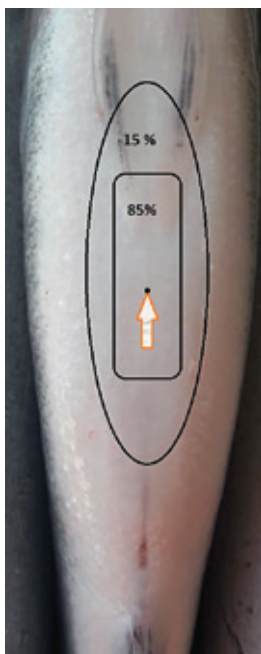
Slika 48. Posuda s anestetikom

7. Ribe koje će se cijepiti moraju biti mirne na stolu za cijepljenje



Slika 49. Stol za cijepljenje

8. Brzina rada treba biti prilagođena vještinama operatera i sadržaj injekcije mora biti apliciran pod kutem od 90 stupnjeva od trbušne stijenke te pod laganim pritiskom kako bi se izbjegle ozljede u točki injekcije kao što je pokazano na slici. Cjepivo bi trebalo lako ući u trbušnu šupljinu i igla se ne smije izvaditi prije nego što se injicira cijela doza cjepiva
9. Kod lubina je odgovarajuća točka za injekciju u srednjoj liniji oko jedne i pol dužine trbušne peraje iza osnove trbušne peraje (Slika 50)



Slika 50. Određivanje točke za injekciju

10. Cjepivo mora biti homogeno cijelo vrijeme
11. Otvorena boca cjepiva mora se iskoristiti unutar 12 sati
12. Igla se mora promijeniti kada postane oštećena ili tupa, ili nakon što je cijepjeno 2000 riba
13. Potrebno je redovito micati ljuste s igle kako se ne bi promijenila duljina igle
14. Tijekom cijepljenja potrebno je nježno rukovati ribama kako bi se izbjegao stres ili oštećenja (Slika 51)



Slika 51. Rutinski rad na stolu za injekciono docjepljivanje

15. Izvođači moraju imati čiste rukavice te ih redovito mijenjati kako bi se izbjegla kontaminacija

16. Treba praktimirati redovitu kontrolu učinkovitosti primjene cjepiva na način da se lagano pritisne trbušna stijenka ribe na mjestu cijepjenja i čeka pojava bjelkaste tekućine. Neke se jedinke žrtvuju radi provjere prisutnosti i količine cjepiva u tjelesnoj šupljini kako bi se mogao korigirati postupak cijepjenja
17. Neprikladna primjena cjepiva može uzrokovati ozljede crijeva i drugih unutarnjih organa
18. Nakon primjene cjepiva, riba se treba otpustiti u bazen za oporavak ili direktno u novi kavez te bi trebale početi plivati vrlo brzo nakon cijepjenja (Slika 52)



Slika 52. Otpuštanje cijepjenih riba u novi kavez

C. Nakon cijepjenja

1. Riba se moraju oporaviti nakon cijepjenja, a trebale bi se potpuno oporaviti u roku tjedan dana
2. Cijepjenoj ribi treba ponuditi male količine hrane jedan dan nakon cijepjenja tijekom ljeta ili 2-3 dana nakon cijepjenja zimi. Hrana ne prolazi kroz crijevo par dana nakon cijepjenja i ako ih se hrani, hrana može fermentirati te uzrokovati enteritis
3. Mortalitet je nakon cijepjenja uobičajeno nizak i većina jedinki počne jesti normalno unutar tjedan dana

Literatura

FAO/OIE/WHO (2003). Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: *Scientific assessment*. Geneva, December, 1–5 2003.

Pharmaq Zoetis. Vaccination Manual.

Rigos, G., Kogiannou, D., Padrós, F., Cristofol, C., Florio, D., Fioravanti, M., & 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. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1285-1323.

Smith, P. (2012). Antibiotics in aquaculture: reducing their use and maintaining their efficacy. In *Infectious Disease in Aquaculture* (pp. 161-189). Woodhead Publishing.

Zrnčić, S. (2020). Correct diagnostics: prerequisite for prudent and responsible antimicrobial administration. *Asian Fisheries Science*, 33(S1), 27-32.

PARTNERI

ISTRAŽIVAČKI INSTITUTI

- LP** SVEUČILIŠTE UDINE
Odjel za znanost, hranu, poljoprivredu i zaštitu okoliša
- 1** HRVATSKI VETERINARSKI INSTITUT
- 2** SVEUČILIŠTE TRST
Odjel za prirodne znanosti
- 3** INSTITUT ZA OCEANOGRAFIJU I RIBARSTVO
- 4** EKSPERIMENTALNI ZOOPROFILAKTIČKI INSTITUT VENECIJA
- 5** SVEUČILIŠTE U RIJECI
Fakultet za menadžment u turizmu i ugostiteljstvu
- 6** TALIJANSKI NACIONALNI ODBOR ZA ISTRAŽIVANJA
Institut za biomolekularnu kemiju

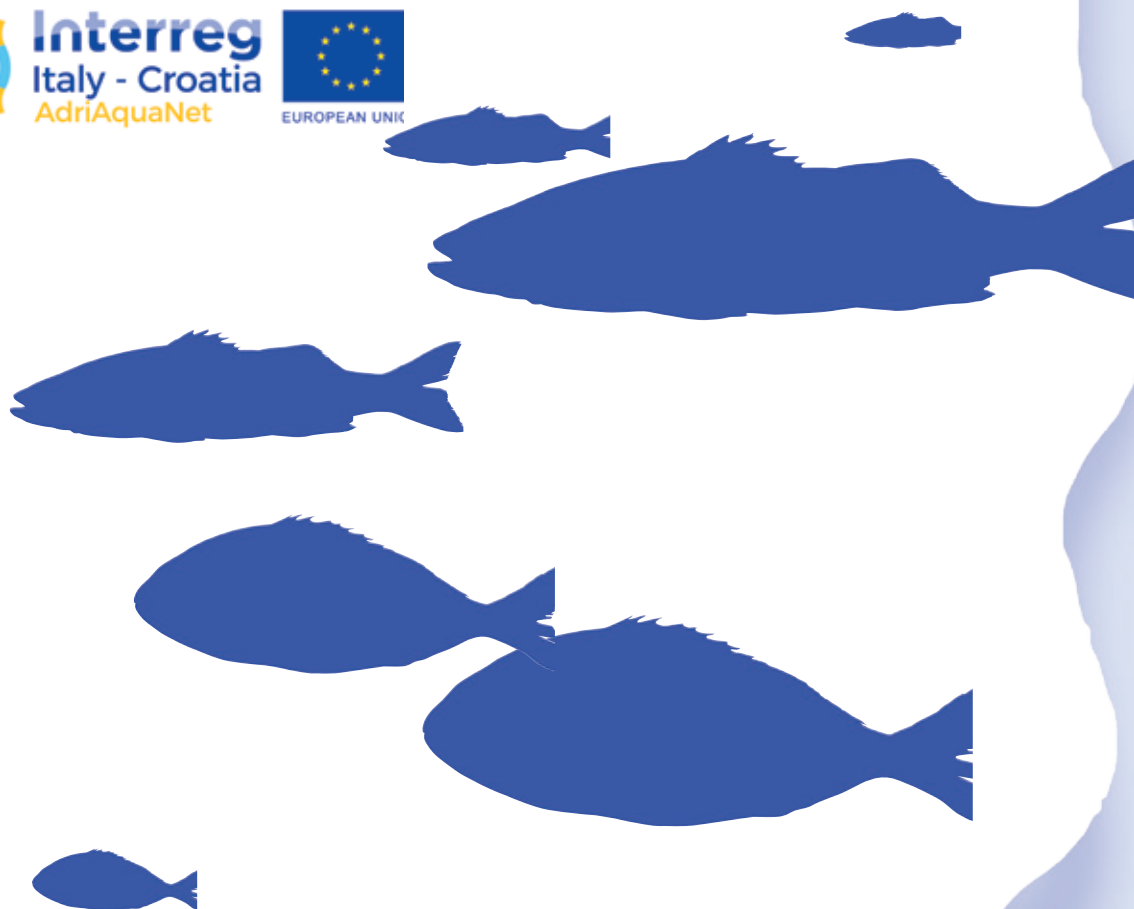
UDRUŽENJA

- 7** KLASTER MARIKULTURA

MALA I SREDNJA PODUZEĆA

- 8** FRIŠKINA d.o.o.
- 9** ITTICA CALDOLI
- 10** ORADA ADRIATIC d.o.o.
- 11** FRIULTROTA DI PIGHIN d.o.o.





Jadranska marikultura opskrbljuje visokokvalitetnim ribljim proizvodima lokalna tržišta ali i tržišta okolnih zemalja. Da bi se osigurao daljnji ekonomski razvoj ovog sektora uz ekološku i društvenu održivost, znanstvenici i proizvođači s obje strane Jadrana; Italije i Hrvatske su pokrenuli projekt **“JAČANJE INOVACIJA I ODRŽIVOSTI U JADRANSKOJ AKVAKULTURI” – ADRIAQUANET.**

ADRIAQUANET KONZORCIJ je sastavljen od znanstvenika iz sedam istraživačkih institucija, četiri proizvodne organizacije i udruženja uzgajivača iz Italije i Hrvatske. Aktivnosti su financirane iz programa Interreg Italy-Croatia 2014-2020, do lipnja 2022. Koordinator konzorcija je prof. Marco Galeotti s Univerziteta u Udinama, Italija.

ZAJEDNIČKI SU DEFINIRALI TRI GLAVNA CILJA:

UZGOJ RIBA: unaprjeđenje uzgoja riba uvođenjem inovacija u tehnologiju hranidbe i zbrinjavanja otpadnih tvari.

ZDRAVLJE RIBA: jačanje otpornosti na bolesti primjenom novih cjepiva, probiotika i prirodnih lijekova. Primjena principa dobrobiti riba je strateška odrednica u preventivi pojave bolesti.

MARKETING: procjena kvalitete riba uzgojenih na uzgajalištima uz principe dobrobiti u ekološki povoljnim uvjetima temeljem analize higijenskih, senzoričkih i nutritivnih parametara te njena promocija kao razvoj i promocija novih proizvoda od ribe koji će zadovoljiti potrebe tržišta