

PREVALENCIJA I ZNAČAJKE POTENCIJALNO PATOGENIH *Vibrio* spp. IZDVOJENIH IZ ŠKOLJKAŠA PROIZVODNIH PODRUČJA ISTARSKOGA AKVATORIJA

Džafić, Natalija

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:414124>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)
[Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Natalija Džafić

**PREVALENCIJA I ZNAČAJKE POTENCIJALNO
PATOGENIH *Vibrio* spp. IZDVOJENIH IZ
ŠKOLJKAŠA PROIZVODNIH PODRUČJA
ISTARSKOGA AKVATORIJA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Msc. Natalija Džafić

**PREVALENCE AND CHARACTERIZATION OF
POTENTIALLY PATHOGENIC *Vibrio* spp.
ISOLATED FROM SHELLFISH OF PRODUCTION
AREAS OF THE ISTRIAN AQUATORY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

mr. sc. NATALIJA DŽAFIĆ

**PREVALENCIJA I ZNAČAJKE POTENCIJALNO
PATOGENIH *Vibrio* spp. IZDOJENIH IZ
ŠKOLJKAŠA PROIZVODNIH PODRUČJA
ISTARSKOGA AKVATORIJA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

doc. dr. sc. Andrea Humski
prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Msc. Natalija Džafić

**PREVALENCE AND CHARACTERIZATION OF
POTENTIALLY PATHOGENIC *Vibrio* spp.
ISOLATED FROM SHELLFISH OF PRODUCTION
AREAS OF THE ISTRIAN AQUATORY**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Assist. Prof. Andrea Humski, PhD
Full Prof. Lidija Kozačinski, PhD

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Natalija Džafić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2022.

Doktorski rad je izrađen u Zavodu za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentori: doc. dr .sc. Andrea Humski
prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Doktorski rad ima:

121 stranicu

31 sliku

46 tablica

ZAHVALA

Bez dvije predivne žene ovaj rad nikada ne bi ugledao svjetlo dana, stoga se najiskrenije zahvaljujem mentoricama, prof. dr. sc. Lidiji Kozačinski i doc. dr. sc. Andrei Humski, na svim savjetima, primjedbama i prijedlozima koje su mi nesebično davale tijekom laboratorijskog rada te izrade disertacije.

Zahvaljujem se suradnicima u Veterinarskom zavodu Rijeka koji su sudjelovali u laboratorijskoj obradi uzoraka. Posebno se zahvaljujem dr. sc. Sanji Duvnjak, na savjetima i riječima ohrabrenja.

Zahvaljujem ravnatelju HVI izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu na podršci koju mi je pružio.

Veliko hvala akademiku Željku Cvetniću.

Hvala mojoj sestri i najboljoj prijateljici koja je strpljivo i bez prigovora slušala "dnevne izvještaje" o svemu što sam učinila i tek trebam učiniti.

Hvala mojim roditeljima na strpljenju i vjeri u mene.

Hvala Senadu, Sari i Janu što su me čekali.

Za moju obitelj

SAŽETAK

PREVALENCIJA I ZNAČAJKE POTENCIJALNO PATOGENIH *Vibrio* spp. IZDVOJENIH IZ ŠKOLJKAŠA PROIZVODNIH PODRUČJA ISTARSKOGA AKVATORIJA

U RH školjkaši se uzgajaju cijelom obalom Jadranskoga mora. Uzgoj, izlov i promet školjkašima reguliran je brojnim zakonskim aktima kojima je cilj stavljanje na tržište sigurne hrane, no zakonodavstvo ne predviđa kontrolu *Vibrio* spp., pa postoji mogućnost da se na tržištu nalaze školjkaši kontaminirani bakterijama ovoga roda koje mogu uzrokovati pojavu bolesti u ljudi. Kako su potencijalno patogeni vibriji vrlo prošireni u prirodi, osobito u morskoj i slatkoj vodi, obalama mora i koritima rijeka, često se dokazuju u različitim vrstama akvatičnih životinja. U našem istraživanju pretražena su ukupno 632 uzorka školjkaša iz istarskoga akvatorija kako bi se dokazala prisutnost najznačajnijih, potencijalno patogenih vibrija, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus*. Korištena je standardna mikrobiološka metoda HRN EN ISO 21872-1:2017, te molekularne PCR metode koje su dokazale veću prevalenciju (23,89 %) u odnosu na 2,37 %, koliko je postignuto mikrobiološkom metodom. PCR metodama za dokazivanje genoma bakterija dokazane su sljedeće prevalencije: *V. cholerae* 0,95 %; *V. parahaemolyticus* 17,72 % (uz temperaturu prednamnažanja 41,5 °C), odnosno 15,36 % (uz temperaturu prednamnažanja 37 °C); *V. vulnificus* 3,96 % (uz temperaturu prednamnažanja 41,5 °C), odnosno 7,87 % (uz temperaturu prednamnažanja 37 °C). Po prvi put u RH dokazana je prisutnost bakterije *V. cholerae* u školjkašima, te geni bakterije *V. parahaemolyticus* *tdh* i *trh* uz prevalenciju od 1,6 % odnosno 6,4 %, koji kodiraju enterotoksine odgovorne za simptome oboljenja ljudi. Utvrđeni izgledi za dokazivanje vrste *V. parahaemolyticus* bili su 5,18 puta veći ako je temperatura mora iznad 15 °C ($P < 0,001$). S javnozdravstvenog gledišta od izrazite je važnosti nalaz potencijalno patogenih bakterija roda *Vibrio*. Uz povišenu temperaturu mora i zraka, u vrhuncu turističke sezone kada je najveća potražnja za dagnjama, kamenicama, kapicama, kunjkama i rumenkama, ti morski plodovi mogu biti izvor infekcije, te je potrebno pratiti njihovu pojavnost s ciljem zaštite zdravlja ljudi.

Ključne riječi: dvoljušturni školjkaši, potencijalno patogeni *Vibrio* spp., mikrobiološka pretraga, lančana reakcija polimerazom (PCR)

EXTENDED ABSTRACT

INTRODUCTION

The cultivation of bivalve molluscs is an activity performed by numerous individuals and organizations in the Republic of Croatia, as shellfish are a traditional food of the country's whole coastal area. Their peculiarity lies in the consumption without thermal processing, or eventually, with only partial thermal processing. Shellfish cultivation, harvesting, and trade are all regulated by numerous legislations, which aim to put healthy foods on the market. However, the European Legislation does not call for the *Vibrio* spp. examination – this could result in placing the shellfish contaminated by the bacteria of this genus on the market, their consumption, and consequently, human illness. The potentially pathogenic vibrios are widely spread in nature, especially within salt and fresh water, at the seacoasts and riverbeds, and are often detected in various species of aquatic animals.

METHODS

This paper presents the most important potentially pathogenic halophilic vibrios, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, detected in bivalve molluscs harvested in the Istrian aquatory. A total of 632 samples from 18 locations were analysed. The bivalve molluscs samples collected in the period of time from March 2017 to March 2020 included mussels, oysters, scallops, Noah's Ark shell and Smooth Venus clam. The following methods were used: the microbiological method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* (HRN EN ISO 21872-1:2017), and the polymerase chain reactions (PCR) for the detection of *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. vulnificus*. The polymerase chain reaction (PCR) was also used for the detection of *tdh* and *trh* genes of the positive *Vibrio parahaemolyticus*. The PCR methods were used for confirmation of the bacterial isolates, after biochemical identification. They were also used for the detection of presence of all potentially pathogenic *Vibrio* spp. in the secondary enrichment broths.

RESULTS

The classical microbiological method, used on a total of 632 shellfish samples, detected the prevalence of 2.37 % for the potentially pathogenic *Vibrio* spp., while molecular PCR techniques detected a total prevalence of 23.89 % of potentially pathogenic *Vibrio* spp., when applied in secondary enrichment broth of all 632 samples. Among 15 confirmed isolates, one was *V. cholerae* detected in Noah's Ark shell which presents the first detection of *V. cholerae* in shellfish sample in Croatia; two isolates were *V. vulnificus* detected in mussels and oysters and 12 isolates of *V. parahaemolyticus* detected in mussels, Noah's Ark shell and oysters in 8, 3 and 1 samples respectively. The PCR method for the detection of *V. cholerae* genes detected a prevalence of 0.95 %. The use of the PCR method for the detection of *V. parahaemolyticus* genes detected a prevalence of 17.72 % with the enrichment temperature of 41.5 °C, while the prevalence of 15.36 % was detected with the enrichment temperature of 37 °C. The use of the PCR method for the detection of *V. vulnificus* genes detected a prevalence of 3.96 % with the enrichment temperature of 41.5 °C, while the prevalence of 7.87 % was detected with the enrichment temperature of 37 °C. The PCR method for the detection of *tdh* and *trh* genes of the *V. parahaemolyticus* revealed no positive among 12 isolates, while the same method detected a prevalence of 1.6 % and 6.4 % respectively within the total number of positive *V. parahaemolyticus* samples when applied on secondary enrichment broth. Detection of *tdh* and *trh* genes of the *V. parahaemolyticus* presents the first finding in Croatia indicating possible risk for consumers.

CONCLUSIONS

The use of the ISO method within the classical microbiological method show lower prevalence compared to the results obtained with the molecular PCR technique, which implies that the quality of selective culture media and incubation conditions needs further improvement. The used PCR methods are reliable, but time-consuming, since an individual PCR test has to be conducted for each bacterial species. Hence, it is necessary to try to implement multiplex PCR methods, according to the references, which would reduce the time required to obtain results. A larger percentage of positive samples within the Noah's Ark shell and the Smooth Venus clam population were noticed at the harvesting areas of multiple shellfish species, which could be used for the selection of indicator types for the

occurrence monitoring of potentially pathogenic *Vibrio* spp. The determined odds for the detection of *V. parahaemolyticus* species are 5.18 times higher with the sea temperature above 15 °C ($P < 0.001$). Obtained results in all indicate the presence of potentially pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish harvested in the Istrian aquatory and the need for the introduction of regular monitoring of their presence. Using the results achieved, the time of greatest risk for consumers can be selected, when it is necessary to monitor the presence of potentially pathogenic *Vibrio* spp. with the aim of protecting human health.

Key words: bivalve molluscs, potentially pathogenic *Vibrio* spp., microbiological method, polymerase chain reaction (PCR)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	3
2.1. Anatomija i fiziologija dvoljuštornih školjkaša	3
2.2. Izvori kontaminacije dvoljuštornih školjkaša.....	8
2.3. Potencijalno patogeni halofilni vibriji.....	10
2.3.1 <i>Vibrio cholerae</i>	11
2.3.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	14
2.3.3 <i>Vibrio vulnificus</i>	15
2.4. <i>Vibrio</i> spp. u zemljama Mediterana.....	17
2.5. Globalna rasprostranjenost <i>Vibrio</i> spp.....	20
2.6. Klimatske promjene	22
2.7. Zakonodavni okvir	24
2.8. Mogućnost primjene različitih tehnoloških postupaka s ciljem uklanjanja potencijalno patogenih vibrija.....	25
2.8.1. Pročišćavanje školjkaša.....	25
2.8.2. Ostali tehnološki postupci	26
2.9. Metode dokaza <i>Vibrio</i> spp.....	27
2.9.1. Metode za dokazivanje prisutnosti, brojanje i biokemijsku identifikaciju potencijalno patogenih <i>Vibrio</i> spp.	27
2.9.2. Molekularne metode.....	30
2.10. Uzgoj školjkaša	34
2.10.1. Uzgoj i izlov dagnji.....	34
2.10.2. Uzgoj i izlov kamenica.....	37
3. OBRAZLOŽENJE TEME	38
4. MATERIJAL I METODE.....	39
4.1. Uzorci.....	39

4.2. Geografska područja za uzgoj i izlov školjkaša	41
4.3. Metode rada.....	44
4.3.1. Metoda za dokazivanje prisutnosti i biokemijsku identifikaciju potencijalno enteropatogenih <i>Vibrio</i> spp.	44
4.3.2. Molekularna dijagnostika lančanom reakcijom polimerazom (PCR)	46
4.3.3. Obrada podataka o vremenskim uvjetima i temperaturi mora	51
4.3.4. Statistička obrada podataka	51
5. REZULTATI.....	52
5.1. Rezultati mikrobiološke pretrage	52
5.2. Rezultati molekularne dijagnostike lančanom reakcijom polimerazom (PCR) na prednamnoženim uzorcima	59
5.2.1. <i>V. cholerae</i>	59
5.2.2. <i>V. parahaemolyticus</i> (41,5 °C).....	64
5.2.3. <i>V. vulnificus</i> (41,5 °C).....	69
5.2.4. <i>V. parahaemolyticus</i> (37 °C).....	73
5.2.5. <i>V. vulnificus</i> (37 °C).....	76
5.2.6. Podudarnost rezultata dokaza prisutnosti vrsta <i>V. parahaemolyticus</i> i <i>V. vulnificus</i> PCR metodom pri temperaturama prednamnažanja 41,5 °C i 37 °C.....	79
5.2.7. Rezultati dokazivanja prisutnosti gena za kodiranje toksina bakterije <i>V. parahaemolyticus</i> u uzorcima nakon prednamnažanja pri temperaturama 41,5 °C i 37 °C	82
5.2.8. Skupni rezultati pretraživanja mikrobiološkom i PCR metodama za dokaz prisutnosti potencijalno patogenih <i>Vibrio</i> spp.....	85
6. RASPRAVA	89
7. ZAKLJUČCI.....	98
8. POPIS LITERATURE	99
9. ŽIVOTOPIS	117

1. UVOD

Veterinarsko javno zdravstvo u svojim osnovnim postavkama ima zadatak osigurati zaštitu zdravlja životinja i time zaštitu zdravlja ljudi. U provođenju mjera veterinarskog javnog zdravstva sudjeluje čitav niz stručnjaka, od uzgajivača životinja, preko proizvođača i prerađivača hrane, do inspektora i laboratorijskog osoblja.

U Republici Hrvatskoj uzgoj školjkaša je djelatnost kojom se bavi veći broj pojedinaca i udruženja, jer školjkaši predstavljaju tradicionalnu hranu u cijelom priobalnom području. Specifičnost školjkaša kao hrane leži u činjenici što se u prodaji školjkaši nalaze kao žive životinje, a samo manjim dijelom kao djelomično prerađeni proizvod (očišćeni i zamrznuti školjkaši). Posebnost školjkaša nadalje leži u činjenici da se konzumiraju toplinski neobrađeni, ili tek djelomično toplinski obrađeni. Takve namirnice su nezamjenjiv dio turističke ponude i kako je već rečeno tradicionalne prehrane, i stoga je jasna potreba procjene sigurnosti školjkaša kao hrane.

Provjera sigurnosti školjkaša kao hrane podrazumijeva praćenje njihovog mikrobiološkog onečišćenja putem najvjerojatnijeg broja bakterije *Escherichia coli* (Most Probably Number; MPN *E. coli*) kao indikatora fekalnog onečišćenja, te praćenje pojavnosti morskih biotoksina iz skupina Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), Diarrhetic Shellfish Poisoning, (DSP), Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP), Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) i Azaspiracid Poisoning (AZP). DŽAFIĆ (2012.) je navedenu problematiku istraživala na području Istarske županije, te naglasila potrebu i opravdanost praćenja mikrobiološkog onečišćenja školjkaša, kao i praćenje pojavnosti biotoksina. Također, zaključuje da praćenje najvjerojatnijeg broja bakterije *E. coli*, kao mikrobiološkog indikatora onečišćenja školjkaša, ima ograničenu vrijednost kod procjene opasnosti prilikom konzumacije školjkaša onečišćenih prirodno prisutnim patogenima, kao što su bakterije *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* te virusima antropogenog podrijetla, pogotovo norovirusa i virusa uzročnika hepatitisa A. ŠKOKO (2015.) je objavila rezultate svojih istraživanja o prisutnosti norovirusa izdvojenih iz školjkaša iz proizvodnih područja RH, pri čemu je ustanovljena prevalencija od 10,61 %, a također je utvrđena sezonska varijacija s najvećim brojem pozitivnih uzoraka u zimskim mjesecima. Dosadašnja pojavnost *Vibrio spp.* u živim školjkašima i morskim ribama u Republici Hrvatskoj rijetko je istraživana, i to na uzorcima

na tržištu (JAKŠIĆ i sur., 2002.), dok u primarnoj fazi proizvodnje školjkaša sjevernog Jadrana zapravo takva istraživanja nisu zabilježena, osim kao pretraživanja pojedinačnih uzoraka iz Limskog kanala (IVEZIĆ-JAKŠIĆ, 1986.).

U vezi s navedenim, našim smo istraživanjem, za razliku od prethodnih usmjerenih na pojedinačne uzorke riba i školjkaša, obuhvatili sustavno istraživanje prisutnosti potencijalno patogenih bakterijskih vrsta roda *Vibrio* u školjkašima na području istarskoga akvatorija.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Anatomija i fiziologija dvoljušturnih školjakaša

DAGNJA (*Mytilus galloprovincialis*) je dvoljušturni školjkaš, pripada rodu *Mytilus*, porodici Mytilidae, redu Mytiloida, razredu Bivalvia, koljenu Mollusca.

KAMENICA (*Ostrea edulis*) je dvoljušturni školjkaš, pripada rodu *Ostrea*, porodici Ostreidae, redu Ostreoida, razredu Bivalvia, koljenu Mollusca.

KAPICE (*Aequipecten opercularis*) su dvoljušturni školjkaši, pripadaju rodu *Aequipecten*, porodici Pectinidae, redu Pectinida, razredu Bivalvia, koljenu Mollusca.

Osnovna anatomska karakteristika dvoljušturnih školjakaša zajednička pripadnicima razreda Bivalvia, podrazumijeva postojanje dvije čvrsto spojene ljuštore koje obavijaju meka tkiva u unutrašnjosti.



Slika 1. Asimetrična ljuštura kamenice
(foto: N. Džafić)

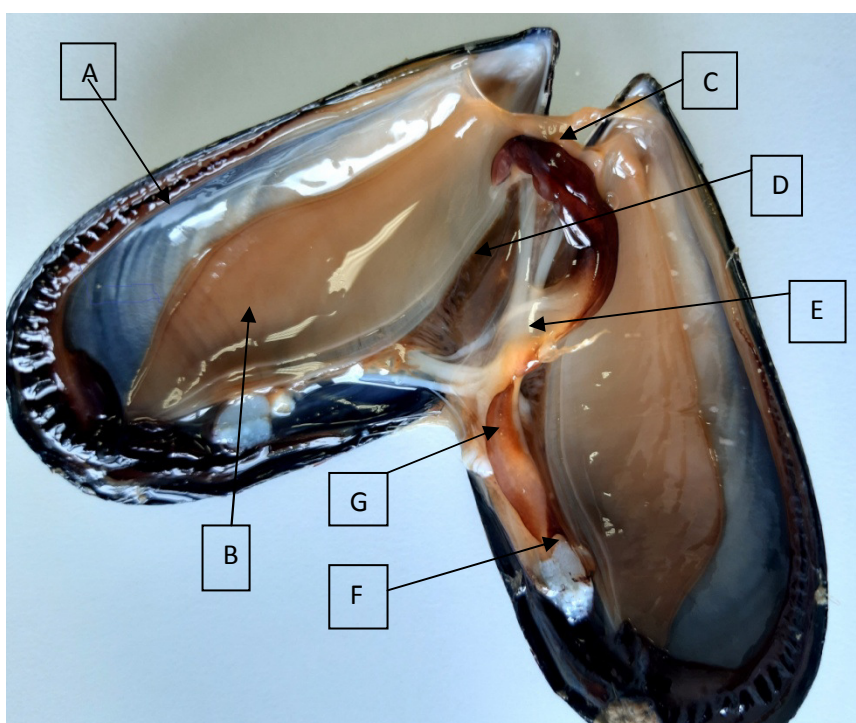


Slika 2. Asimetrična ljuštura kapice
(foto: N. Džafić)

Ljuštore mogu biti simetrične kao u dagnji i kućica, ili asimetrične kao u kamenica i kapica (slike 1. i 2.). Međusobno su povezane jednim (dagnje i kućice) ili dvama (kamenice i

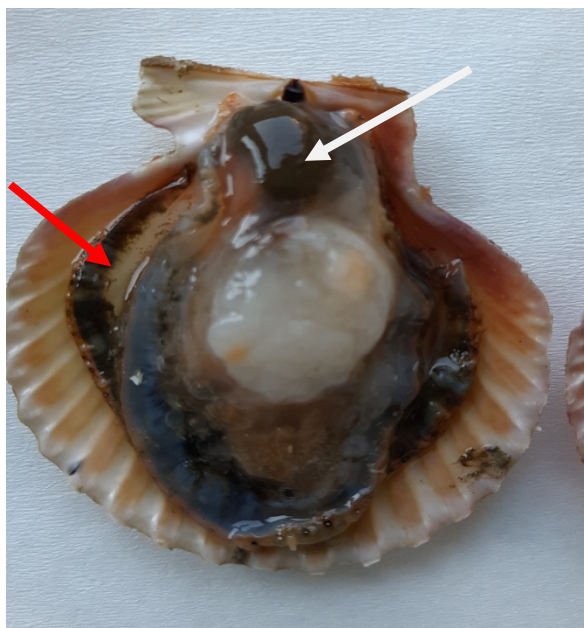
kapice) aduktornim mišićima kojima je glavna funkcija zatvaranje i otvaranje ljuštura. Kod nekih vrsta kao što je kapica, aduktorni mišić potpomognut plaštom služi i za kretanje školjkaša po morskom dnu naglim istiskivanjem vode iz tjelesnih šupljina u trenutku zatvaranja (<https://www.museum.zoo.cam.ac.uk/collections-research/ddf-bivalve-mollusc-project/anatomy-bivalve>).

Troslojne ljušture, građene uglavnom od kalcijevog karbonata, na dorzalnom su dijelu spojene zglobnim ligamentom (elastični proteini) koji funkcionira poput opruge: kad su ljušture spojene, ligament je maksimalno istegnut, opuštanjem aduktornog mišića ljuštura se otvaraju jer se ligament stegne (slika 3.).



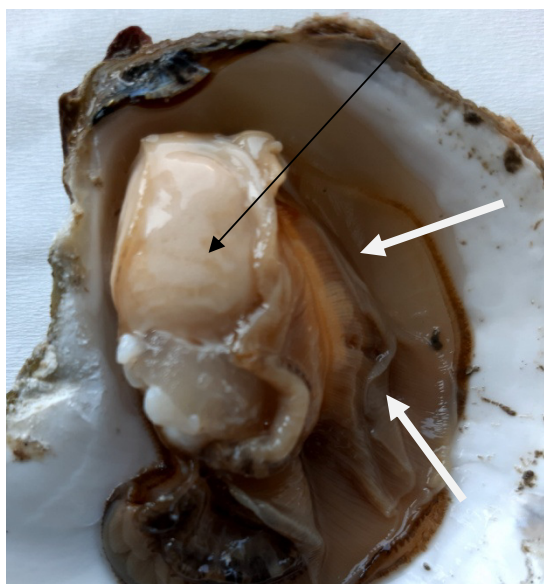
Slika 3. Unutarnji organi dagnje *Mytilus galloprovincialis*: A-plašt, B-škrge, C-želudac, D-probavna žlijezda, E-rudimentirano stopalo s bisusom, F-aduktorni mišić, G-gonade (foto: N. Džafić)

Unutarnje organe obavija plašt (slika 4.), kojem je glavna funkcija sekrecija građevnih tvari ljuštura. Također ima osjetilnu funkciju kojom u nepovoljnim okolnostima pokreće zatvaranje ljuštura, te sudjeluje u disanju.



Slika 4. Unutarnji organi kapice - crvena strelica pokazuje plašt, bijela probavnu žlijezdu (foto: N. Džafić)

Otvaranjem ljuštura u unutrašnjost školjkaša ulazi voda i filtrira se kroz dva para škrga (slika 5.) koje imaju dvostruku funkciju, disanje i filtriranje hranjivih čestica iz vode.



Slika 5. Unutarnji organi kamenice – crna strelica pokazuje gonade, bijele pokazuju škrge (foto: N. Džafić)

Filtrirane hranjive tvari se pomoću dva zakrilca usmjeravaju prema labijalnim dlanovima koji okružuju usta. Kuglice hrane kratkim jednjakom dolaze do vrećastog želudca

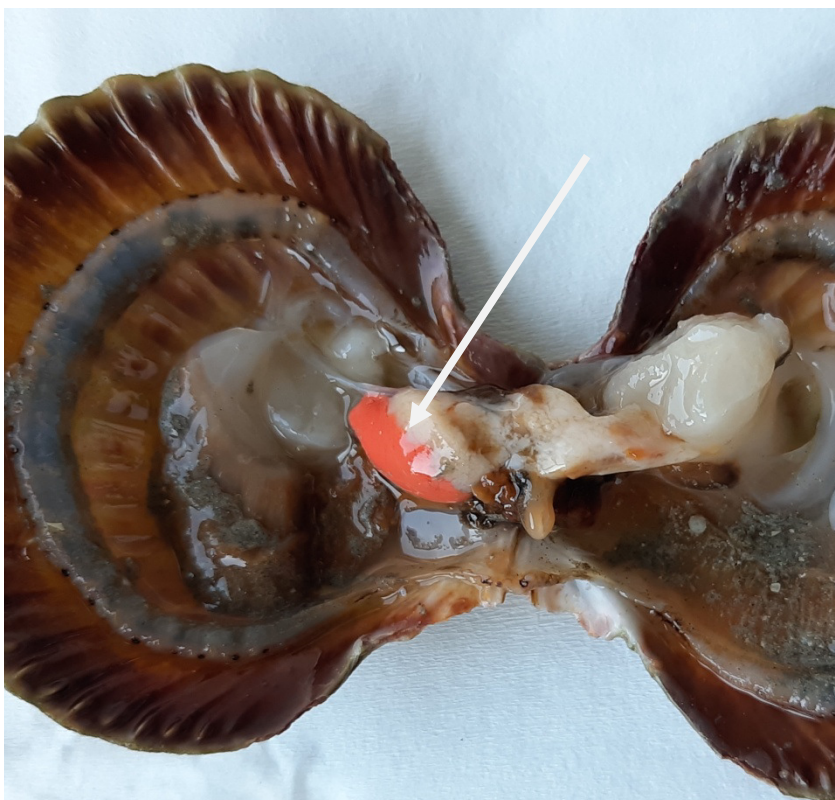
podijeljenog u komore i okruženog probavnom žlijezdom (slika 6.), te potom u zavojito crijevo koje završava rektumom i u nekih vrsta školjkaša anusom.



Slika 6. Probavna žlijezda kamenice nakon uklanjanja plašta, škrge i gonada (foto: N. Džafić)

Želudac ima još jedan otvor koji vodi do vrećaste cijevi u kojoj se nalazi kristalična igla sastavljena od slojeva mukoproteina, a služi miješanju hrane u želudcu i oslobađanju probavnih enzima. Probavljena hrana prenosi se jedva primjetnim venama do jednostavnog srca građenog od dvije pretklijetke i jedne klijetke, te potom prednjom i stražnjom aortom do svih dijelova tijela.

Školjkaši mogu biti odvojenog spola ili hermafroditi pri čemu kod nekih vrsta dolazi do promjene spola. Spol se u nekih vrsta može razlučiti po boji zrelih gonada prije mrijesta, tako su u muških kapica gonade bijele, a u ženskih crvene (slika 7.). Bubrežni sustav je jedva uočljiv, a sastoji se od dva bubrega koji se prazne u tjelesnu šupljinu. Slabo razvijeni živčani sustav sastoji se od tri para ganglija s pripadajućim poveznicama (HELM i BOURNE, 2004.).



Slika 7. Kapica - strelica pokazuje gonade (foto: N. Džafić)

2.2. Izvori kontaminacije dvoljuštornih školjkaša

Razmatrajući školjkaše u okviru problematike veterinarskog javnog zdravstva, moramo imati na umu dva izvora kontaminacije školjkaša patogenim i potencijalno patogenim mikroorganizmima. U prvom slučaju, izvor patogenih mikroorganizama uključuje bakterije i parazite koji potječu iz fecesa ljudi, životinja i ptica, te viruse antropogenog podrijetla, a koji mogu kontaminirati ušća ili morsku vodu. Drugi izvor uključuje potencijalno patogene halofilne vibrije, kao što su *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* (LEE i YOUNGER, 2002.) prirodno prisutne u takvim vodama. Isti autori identificirali su u uzorcima školjkaša sljedeće mikrobiološke opasnosti: bakterije iz rodova *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, enteropatogenu *Escherichia coli* O 157, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia* spp., *Vibrio* vrste, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*; patogene protozoe kao što su *Cryptosporidium*, *Giardia* i *Entamoeba histolytica*; patogene viruse kao što su Norwalk-like virusi, rotavirusi, polio i drugi enterovirusi te virus hepatitisa A. Onečišćenje školjkaša nastaje kao posljedica selektivnog filtriranja čestica fitoplanktona, zooplanktona, virusa, bakterija i anorganskih tvari iz vode u prirodnom procesu hranjenja školjkaša.

Najveći broj mikroorganizama u more dopiye nepročišćenim ili djelomično pročišćenim gradskim otpadnim vodama, no isto tako, mikrobiološko onečišćenje može biti prouzročeno ispiranjem tla jakim kišom i vjetrom, kao i balastnim vodama iz brodova, a more mogu onečistiti i kupači (KRSTULOVIĆ i ŠOLIĆ, 1997.). U zemljama u razvoju značajan problem predstavljaju vode kontaminirane neodgovarajuće obrađenom kanalizacijskom vodom, te s visokom koncentracijom bakterija koje uzrokuju bolesti i time povećavaju učestalost emergentnih patogena (IGBINOSA i OKOH, 2008.). Za razliku od drugih mikroorganizama, bakterije iz roda *Vibrio* prirodno su prisutne u morskoj vodi i njihove koncentracije variraju sezonski. Većina vrsta može živjeti u širokom rasponu saliniteta, a brojnost im se povećava s porastom temperature (WITTMAN i FLICK, 1995.).

Dvoljuštorni školjkaši se hrane filtriranjem hranjivih čestica iz vode u kojoj žive, a u jednom satu mogu profiltrirati i više od osam litara vode i time bioakumulirati prirodno prisutne ili antropogene kontaminante prenoseći ih do potrošača (LEES, 2000.; RIBARIĆ i sur., 2012.). Kontaminanti u školjkašima uključuju patogene vrste mikroorganizama koje mogu uzrokovati bolesti u ljudi. Neki od tih mikroorganizama služe školjkašu kao hrana u formi planktona, dok druge, neprobavljene akumulira u svojem tijelu. Tek nakon konzumacije

sirovih ili toplinski nedovoljno obrađenih školjkaša, akumulirani mikroorganizmi prelaze u aktivni stadij i uzrokuju bolest ili intoksikaciju koja može ozbiljno ugroziti ljudsko zdravlje a ponekad uzrokovati smrtni ishod (ČADEŽ i TESKEREDŽIĆ, 2005.). Prema ranije objavljenim podacima, nakon konzumacije školjkaša koji su sadržavali akumulirane mikroorganizme uzrok bolesti ljudi su u 27 % slučajeva bili virusi, u 60 % bakterije, a u 3 % paraziti (MEAD i sur., 1999.). Trovanje morskim biotoksinima (fikotoksinima) javlja se ubrzo nakon konzumacije školjkaša kontaminiranih azaspiracidima, okadaičnom kiselinom, pektenotoksinima, jesotoksinima, cikličkim iminima, domoičnom kiselinom, saksitoksinima, brevetoksinima, ciguatoksinima i palitoksinima, najčešće sa želučano crijevnim i neurološkim znacima, dok većina oboljelih opisuje višestruke znakove bolesti (MUNDAY i REEVE, 2013.; KVRGIĆ i sur. 2021.).

Općenito gledajući, postupci sustava HACCP i tehnološki postupci prerade mogu biti dostatni čimbenici u zaštiti konzumenata od oboljenja. No školjkaši zbog njihove jedinstvene fizionomije i različitih načina izlovljavanja, obrade i rukovanja, predstavljaju stvarnu opasnost u sustavu sigurnosti hrane. Kontrola rizika kod njih uz sustav HACCP uključuje upravljanje kakvoćom vode iz okoliša u uzgojnim i izlovnim područjima, a po potrebi još može uključiti postupke pročišćavanja i druge tehnološke postupke uklanjanja patogenih mikroorganizama.

2.3. Potencijalno patogeni halofilni vibriji

Porodica *Vibrionaceae* pripada redu Vibrionales, razredu Gammaproteobacteria. Bakterije porodice *Vibrionaceae* oblika su ravnih ili svinutih štapića, veličine 0,3-1,3 x 1,4-5,0 µm. Pokretljive su i fakultativno anaerobne (NAGLIĆ i sur., 2005.). Isti autori kažu da su u rod *Vibrio* svrstane mnoge gram-negativne bakterije, svinutih stanica. Opisano je 27 vrsta, njih 12 važno je za humanu medicinu, a kao uzročnicima infekcija u riba opisano je 15 vrsta (KONEMAN i sur., 2000.). Vrste *V. cholerae* (non-O1), *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* (*Vibrio carchariae*), zatim *Grimontia* (*Vibrio*) *hollisae* i *Photobacterium* (*Vibrio*) *damselae* uzrokuju bolesti u akvatičnih životinja i ljudi. Dokazano je da *V. vulnificus* ima zoonotski potencijal, a ostale su vrste visoko rizične bakterije koje uzrokuju bolest u riba i ljudi, ali ljudi se najčešće zaraze konzumirajući sirovu ribu, rakove i školjkaše. Različite vrste riba i vodene ptice su rezervoari i vektori ovih bakterija. S obzirom na zoonotski potencijal, AUSTIN (2010.) pripadnike roda *Vibrio* svrstava u mikroorganizme većeg rizika (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus*), i one manjeg rizika (*V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, kao i nekadašnje pripadnike roda *Vibrio* *Grimontia hollisae* – *V. hollisae* i *Photobacterium damsela* - *V. damsela*).

Najpoznatija vrsta u rodu je *V. cholerae*. Infekcije što ih vibriji uzrokuju u čovjeka općenito su svrstane u „kolere“ i „non-kolere“ vibrijske infekcije. Većina „non-kolera“ vibrijskih infekcija u čovjeka javlja se nakon konzumacije sirovih morskih plodova, primjerice kamenica, rakova, školjkaša i školjkaša. Nakon inkubacije od 12 do 52 sata javljaju se u bolesnika znakovi gastroenteritisa kao što su proljev, grčevi, mučnina i povraćanje. Često se vibrijima inficiraju ozljede ili rane na koži prilikom obrade rakova i školjkaša. Septikemijski oblici očituju se vrućicom, tresavicom, generaliziranom mialgijom te bolovima u nogama.

Vibriji su vrlo prošireni u prirodi, osobito u morskoj i slatkoj vodi, obalama mora i koritima rijeka, a vrlo često se dokazuju u različitim vrsta akvatičnih životinja (CVETNIĆ, 2013.).

2.3.1 *Vibrio cholerae*

V. cholerae je prema Gramu negativna, pokretna bakterija s jednom flagelom smještenom polarno. Proizvodi enterotoksin, kolera-toksin odgovoran za razvoj simptoma bolesti. Na osnovi lipopolisaharidnih somatskih O antigena sojevi te bakterije podijeljeni su u serološke skupine. Poznato je više od 200 serotipova bakterije *V. cholerae*, a epidemije kolere uzrokuju sojevi bakterije *V. cholerae* serogrupe O1 i O139. Drugi serotipovi mogu uzrokovati blagi do teški oblik gastroenteritisa pa čak i epidemije sa simptomima kolere (de MAGNY i sur., 2011.). Serogrupa O1 pojavljuje se u 2 biotipa, klasični i El Tor, a oba se mogu klasificirati u tri serotipa, Ogawa, Inaba i Hikojima. Uzročnik kolere osjetljiv je na kiselost ($\text{pH} < 6$ ga uništava, a dobro podnosi $\text{pH} > 6$). Ostali sojevi koji nemaju O1 i O139 antigene (non-O1 i non-O139) ne proizvode kolera toksin, ali se po biokemijskim svojstvima ne razlikuju od uzročnika kolere i uglavnom uzrokuju dijarealne bolesti (RUKAVINA, 2013.).

Prvih šest pandemija kolere uzrokovane su bakterijom serološke grupe O1 (HÄSE i BARQUERA, 2001.), dok je sedma pandemija koja je započela 1961., a traje i danas, uzrokovana novim biotipom bakterije *V. cholerae* O1, El Tor, koji bolje preživljava u težim okolišnim uvjetima. Bolest uzrokovana ovim biotipom obično nije tako teška, kao kod oboljenja uzrokovanih klasičnim O1 biotipom (COLWELL, 1996.). *V. cholerae* O139 posjeduje kapsulu i lipopolisaharidni antigen kao oznaku virulencije, uz to sadrži promijenjenu DNA na O1 kromosomu, u smislu insercije nove regije koja kodira lipopolisaharid i kapsulu O139. HÄSE i BARQUERA (2001.) navode pojavu epidemije kolere iz 1992. godine uzrokovanu serotipom O139. Patogenost sojeva bakterija *V. cholerae* O1 i O139 ovisi o kombinaciji čimbenika virulencije koji uključuju enterotoksin (kolera-toksin CT, gen *ctxA*) te sposobnost vezivanja i kolonizacije stanica tankog crijeva (faktor kolonizacije, *tcpA*). Drugi čimbenici povezani s enteropatogenim učinkom uključuju homolizin sličan El Tor-u (El Tor-like hemolysin: *hlyA*), termostabilni enterotoksin (*stn/sto*), hemaglutinine, neuraminidaze (*nanH*), novi CT, vanjski membranski protein (*ompU*), toksin nalik na Shiga toksin (*Shiga-like toxin (stx)*), ToxR regulatorni protein i *zonula occludens* toksin (*zot*) (RIVERA i sur. 2001).

Prirodna povezanost bakterije *V. cholerae* i zooplanktona kopepoda dokazana je 1982. godine (HUQ i sur., 1983.), kada je elektronskom mikroskopijom potvrđeno specifično vezanje bakterije *V. cholerae* na žive kopepode, najviše u oralnom području i na jajčanoj vreći. Također je dokazano da se navedena bakterija ne veže na uginule kopepode, te da je

preživljavanje bakterije *V. cholerae* duže u prisutnosti živih nego u prisutnosti uginulih kopepoda. Isti su autori dokazali prisutnost bakterije *V. cholerae* u fazi diobe na površini jajčane vreće kopepoda, te time postavili teoriju diseminacije i multiplikacije uzročnika u vodenom okolišu putem jajašaca, suprotno dotadašnjem mišljenju epidemiologa koji su smatrali da su jedini rezervoar bakterije *V. cholerae* probavni organi ljudi i da u vanjskom okolišu uzročnik kratko preživljava. U svojem istraživanju NALIN i sur. (1979.) su utvrdili da inkubacija bakterije *V. cholerae* u kulturi s dodatkom hitina rezultira adsorpcijom vibrija na hitin, te tako vezane bakterijske stanice bolje preživljavaju izlaganje kiselom mediju kakav je u želudcu.

Primjenom odgovarajućih analitičkih metoda bakterija *V. cholerae* se u uzorcima vode može naći tijekom godine (HUQ i sur., 2013.) no odsutnost istog uzročnika ne znači da ga u uzorku nema, jer je poznato da može prijeći u "*viable but nonculturable state*" - VBNC stanje u kojem bakterija ima metaboličku aktivnost, ali se ne može dokazati mikrobiološkim metodama za dokazivanje njezine prisutnosti. U morskom sedimentu se bakterije *V. cholerae* zadržavaju zahvaljujući polarnom električnom naboju. Kako je već rečeno, planktoni imaju važnu ulogu za preživljavanje bakterije *V. cholerae* u vodi, pri čemu u vrijeme "cvjetanja mora", odnosno bujanja fitoplanktonskih zajednica, dolazi do značajnog povećanja broja bakterija, te se infektivna doza od 6×10^6 stanica može naći na tijelu jednog zooplanktona (HUQ i sur., 1983.; LIPP i sur., 2002.). U ekosustavu oceana, sposobnost bakterijske razgradnje hitina ima ključno ekološko značenje. Bakterija *V. cholerae* posjeduje hitinazu koja joj omogućuje korištenje hitina kao izvora ugljika. Također, posjeduje sustav prepoznavanja hitina i sustav kolonizacije crijeva kopepoda (LIPP i sur., 2002.). U istraživanju pojavnosti zooplanktona i incidencije kolere na dva područja Bangladeša, ustanovljeno je da su dominantne skupine zooplanktona na tom području kopepodi, rotiferi i kladocerani povezane s dokazom bakterije *V. cholerae* i/ili pojavom bolesti (de MAGNY i sur. 2011.).

SUITZA i sur. (2009.) ističu školjkaše i morske plodove kao jedan od glavnih izvora kolere u ljudi. U morskoj i slatkoj vodi bakterije *V. cholerae* prisutne su kao slobodnoživuće ili pričvršćene na kopepode (zooplankton) i alge, a dvoljušturni školjkaši, koji se hrane filtriranjem planktona, mogu akumulirati patogene mikroorganizme prisutne u vodi i na planktonu. Pri tome se vrste roda *Vibrio* snažno pričvršćuju za probavni sustav školjkaša i ne mogu se ukloniti ispiranjem i pročišćavanjem. Prilikom pričvršćivanja na površinu

fitoplanktona i zooplanktona, bakterija *V. cholerae* stvara biofilm, dok fitoplanktoni izlučuju cijeli niz organskih tvari koje podržavaju rast pridruženih u formi biofilma i slobodno živućih bakterija *V. cholerae*. Pričvršćivanjem na plankton i stvaranjem biofilma olakšava se preživljavanje bakterije *V. cholerae* u okolišu, povećavajući njenu toleranciju prema niskom pH i visokoj temperaturi. Autori ističu kako je za prevenciju kolere prenosivu morskim organizmima neophodno odgovarajuće tretiranje kanalizacijskih voda, kao i edukacija potrošača s ciljem smanjenja navike konzumacije sirovih ili nedovoljno kuhanih školjkaša u obalnim područjima koja sadrže uzročnika kao prirodno prisutnog patogena.

V. cholerae je halofilna bakterija koja zahtijeva prisutnost iona natrija (Na^+). Postoje dokazi koji ukazuju na povezanost aktivnosti flagele i gena za regulaciju virulencije na način da flagela odgovara na promjene u membranskom potencijalu što rezultira rotacijom flagele, a to može poslužiti kao signal za ekspresiju gena za virulenciju *toxT* (HÄSE i sur., 2001.).

Okoliš je važan čimbenik u epidemiologiji kolere. Gustoća naseljenosti, loša sanitarna i zdravstvena infrastruktura ozbiljni su nedostaci u kontroli i suzbijanju bolesti. Promjena temperature površinske vode i kontaminacija okoliša hranjivim tvarima dovodi do proliferacije fitoplanktona i zooplanktona uz posljedično povećanje brojnosti uzročnika kolere (HARRIS i sur., 2012.). Kopepodi (*Crustacean*), planktonski morski račići i trzalci (*Diptera*, *Chironomidae*), vodeni kukci, prirodni su rezervoari vrste *V. cholerae*. Poznato je da mnoge vrste riba mogu biti rezervoari i vektori bakterije *V. cholerae*. Do sada je bakterija *V. cholerae* izdvojena iz 22 vrste slatkovodnih i devet vrsta morskih riba, a u nekoliko slučajeva dokazan je i serovar O1. Opisana je povezanost konzumacije ili rukovanja sirovom ribom u pojavi nekoliko epidemija kolere. Bakterija *V. cholerae* je izdvojena iz ribljih crijeva, kože, bubrega, jetre i moždanog tkiva. Vodene ptice također imaju važnu ulogu u širenju bakterije jer se hrane inficiranim ribama (HALPERN i IZHAKI, 2017.).

Vibriji mogu preživjeti i razmnožavati se u onečišćenim vodama s povećanom koncentracijom soli pri temperaturi od 10 °C do 30 °C (HARRIS i sur. 2012.). U izolatima bakterije *V. cholerae* iz endemičnih područja kolere u Bangladešu, utvrđena je tolerancija na 6 % soli u 85 % izolata, u njih 45 % na 3 % soli, dok niti jedan nije preživio uzgoj pri koncentraciji od 8 % soli. Isti izolati testirani su na antimikrobnu rezistenciju, pri čemu je utvrđeno da je većina rezistentna na barem dva uobičajena antimikrobna lijeka: 95,45 % je bilo rezistentnih na ampicilin, 50 % na eritromicin, 66,63 % na nalidiksičnu kiselinu, 27,27 % na kotrimoksazol. Rast svih izolata koji su pokazali antimikrobnu rezistenciju uspješno je

inhibirao ekstrakt biljke *Terminalia arjuna*, što ukazuje na mogućnost primjene biljnog ekstrakta za tretiranje multirezistentnih sojeva (FAKRUDDIN i sur., 2011.).

2.3.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Bakterija *V. parahaemolyticus* je prema Gramu negativni, halofilni, svinuti štapić s jednom polarnom flagelom i pokretljiv je kad raste u tekućem mediju.

Većina sojeva bakterije *V. parahaemolyticus* izdvojenih iz okolišnih uzoraka i morskih plodova nije patogena. Za razliku od takvih sojeva, klinički izolati pokazuju sposobnost stvaranja enzima koji lizira eritrocite. Hemolitička aktivnost patogenih sojeva ove bakterije na Wagatsuma agaru poznata je kao *kanagawa fenomen*, a posljedica je prisutnosti termostabilnog direktnog hemolizina TDH (NELAPATI i sur., 2012.). Neki *kanagawa* negativni sojevi proizvode toksin srodan TDH nazvan *TDH-related* hemolizin (TRH). Navedene TDH i TRH hemolizine kodiraju *tdh* i *trh* geni, a smatraju se važnim čimbenicima virulencije. Između različitih serotipova *V. parahaemolyticus* koji uzrokuju infekcije u ljudi, najveća učestalost u kliničkim izolatima pripada serotipu O3:K6. Osim u bakterije *V. parahaemolyticus*, *trh* gen se može naći i u nekih drugih pripadnika roda *Vibrio*. ROSEC i sur. (2012.) smatraju da se *trh* gen može naći u bakterije *V. alginolyticus*, te kao takav ne može biti pouzdan za dokazivanje bakterije *V. parahaemolyticus*.

U jednom od ranijih istraživanja ekologije bakterije *V. parahaemolyticus* potvrđena je ovisnost incidencije bakterije o temperaturi vode (KANEKO i COLWELL, 1973.). Autori su potvrdili da se uzročnik ne može dokazati u vodi tijekom zimskih mjeseci kad je temperatura < 14 °C, iako je prisutan u sedimentu. Porastom temperature vode od kasnog proljeća do ranog ljeta, vibriji koji su prezimili u sedimentu oslobađaju se iz pridnenih zajednica, povezuju na zooplankton te šire stupcem vode. U tropskim i suptropskim područjima koja karakteriziraju visoke temperature tijekom cijele godine nema većih razlika u brojevima bakterije *V. parahaemolyticus* u morskoj vodi, sedimentu i školjkašima u odnosu na promjene temperature morske vode. Broj bakterija *Vibrio* spp. u morskoj vodi ovisi o intenzitetu oborina, a u sedimentu i školjkašima je utvrđen pozitivan utjecaj saliniteta. Značajno veći broj bakterija *Vibrio* spp. i *V. parahaemolyticus* ustanovljen je u uzorcima školjkaša u odnosu na uzorke morske vode i sedimenta (YU i sur., 2013.).

SU i LIU (2007.) navode da distribucija bakterije *V. parahaemolyticus* u morskoj vodi ovisi o temperaturi, pa se rijetko pojavljuje dok temperatura mora ne dosegne 15 °C ili više. Kako je prevalencija *V. parahaemolyticus* u školjkašima također ovisna o temperaturi, mogućnost njegove detekcije veća je u školjkaša izlovljenih tijekom proljeća i ljeta, nego zimi. Autori navode da je broj bakterija *V. parahaemolyticus* u školjkašima nakon izlovljavanja obično manji od 10³ cfu/g, no uvjeti skladištenja pri temperaturama do 26 °C pogoduju njegovom naglom umnažanju za 50 do 790 puta od početne vrijednost tijekom 24 sata.

Adsorpcija bakterije *V. parahaemolyticus* na hitin i kopepode je jedan od najvažnijih čimbenika koji određuju prirodni habitat te bakterije i njenu ekološku nišu (KANEKO i COLWELL, 1975.). Utvrđen je utjecaj saliniteta na adsorpciju na način da povećanje saliniteta sa 4,2 ‰ na 10 - 16 ‰ (vrijednosti saliniteta vode na ušću rijeke Rhode u Chesapeake zaljevu, Sjedinjene Američke Države) smanjuje adsorpciju sa 100 % na 70 - 80 %. Također je utvrđen utjecaj pH pri čemu je 100 % - tna adsorpcija pri pH ~ 6, dok povećanjem pH na ~ 9, adsorpcija pada na 60 %. Autori zaključuju da distribucija ovog mikroorganizma ovisi o temperaturi, salinitetu, pH i drugim okolišnim čimbenicima.

Bakterija *V. parahaemolyticus* jedan je od glavnih uzročnika otrovanja hranom posebno u zemljama poput Japana, Indonezije, Tajvana i drugih gdje se obilno konzumiraju sirovi morski plodovi. Uzročnik stvara enterotoksin koji uzrokuje gubitak tekućine. Već 24 sata poslije konzumacije morskih plodova prisutni su vodenasti proljev, abdominalni grčevi, glavobolja, povraćanje i blago povišenje temperature (LETCHUMANAN i sur. 2014.).

2.3.3 *Vibrio vulnificus*

Bakterija *V. vulnificus* je po Gramu negativni, halofilni štapić, prvi put izoliran 1964. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (BAKER-AUSTIN i OLIVER, 2018.). Ova bakterija odgovorna je za više od 95 % smrtnih slučajeva povezanih s morskom hranom u SAD-u, a i dalje su nepoznati mnogi aspekti vezani za biologiju, genom, virulenciju i epidemiologiju uzročnika. Kao poznatu činjenicu autori navode veću učestalost oboljenja u muškaraca (86 %) nego u žena (14 %), te u ljudi starijih od 40 godina.

Infekcija s bakterijom *V. vulnificus* može se javiti kao infekcija hranom i kao infekcija površinskih rana (LINKOUS i OLIVER, 1999.; BAKER-AUSTIN i OLIVER, 2018.). Isti autori navode infekciju s bakterijom *V. vulnificus* biogrupa 1, kao uzročnikom primarne septicemije u imunokompromitiranih ljudi i onih s povećanim razinama serumskog, slobodnog željeza (obično nakon konzumacije sirovih školjkaša). Osim u vidu primarne septicemije, infekcija može nastati kontaminacijom postojećih rana morskom vodom ili u dodiru s morskim plodovima i ribama. Sojevi bakterije *V. vulnificus* biogrupa 2 poznati su kao uzročnici bolesti jegulja, rakova i riba (LINKOUS i OLIVER, 1999.; AUSTIN, 2010.; CVETNIĆ, 2013.), uz napomenu da barem neki od sojeva unutar biogrupe 2 mogu biti patogeni za ljude (LINKOUS i OLIVER, 1999.).

Izolati bakterije *V. vulnificus* proizvode čitavi niz čimbenika patogenosti, između ostalih to su polisaharidne kapsule, hemolizin, pili tipa IV, različite proteaze (uglavnom serinproteaze), metaloproteaza koju regulira tzv. *Quorum sensing*, koji je učinkovitiji na 25 °C nego na 37 °C, i za kojeg se smatra da bi mogao biti odgovoran za rane na koži udova zbog niže temperature od ostatka ljudskog tijela (AUSTIN, 2010.; CVETNIĆ, 2013.). Povećane koncentracije serumskog željeza čine važan element patogeneze bakterije *V. vulnificus*. Slobodnog željeza u organizmu nema te ga vibriji dobivaju putem siderofora koje se koriste željezom iz transferina ili laktoferina (CVETNIĆ, 2013.). Bakterija *V. vulnificus* simultano proizvodi fenolat i hidroksamat siderofore, pri čemu hidroksamat siderofore omogućuju virulentnim sojevima prihvaćanje željeza od visokozasićenog transferina (LINKOUS i OLIVER, 1999.).

U morskoj vodi bakterije *Vibrio* spp. nađene su slobodne ili pričvršćene na veće i manje planktone, te u sedimentu, pri čemu je utvrđeno da se na većim planktonima (> 200 µm) može naći bakterija *V. alginolyticus*, dok je na manjim planktonima (0,45 - 200 µm) nađena bakterija *V. vulnificus* (MONTANARI i sur., 1999.). Prisutnost bakterije *V. vulnificus* utvrđena je u uzorcima većeg i manjeg planktona, te u uzorcima morske vode, pri čemu je najveća gustoća ustanovljena na uzorcima manjeg planktona tijekom ljetnih mjeseci (MAUGERI i sur., 2006.).

2.4. *Vibrio* spp. u zemljama Mediterana

Tijekom zadnjih dvadesetak godina provedena su istraživanja u zemljama mediteranske regije, koja su redom potvrdila prisutnost vibrija u morskoj vodi, školjkašima, sedimentu, kao i u otpadnim vodama.

U ranijim istraživanjima, krajem 20. stoljeća, duž Jadranskog mora u Hrvatskoj te dijelom u Sloveniji (Izola, Poreč, Limski kanal, Rijeka, Krk, Novigrad, Biograd, Murter, Šibenik - Skrad, Pakoštane i Ston) u različitim uzorcima morske hrane dokazana je pojava *Vibrio* spp., i to u 9,3 % od 150 obrađenih uzoraka. Najzastupljenije vrste bile su *V. parahaemolyticus* u 6,7 % i *V. vulnificus* u 2,7 % obrađenih uzoraka. Pozitivni nalazi bili su utvrđeni na Krku u 20 % uzoraka, Biogradu (14,3 %), Novigradu (8,9 %), Šibeniku – Skradin (8,3 %), Poreču (5,6 %) i Izoli (4,6 %) (IVEZIĆ-JAKŠIĆ, 1986., cit. MIKUŠ i sur., 2010.). JAKŠIĆ i sur. (2002.) navode nalaz bakterije *V. parahaemolyticus* u morskoj hrani na tržnicama i u hotelskoj ponudi. Tako je na tržnicama postotak pozitivnih uzoraka varirao od 4 do 12 %, a najčešće je bakterija *V. parahaemolyticus* dokazana u školjkašima, dok je u uzorcima morske hrane podrijetlom iz hotela taj postotak bio i viši, a kretao se od 10 do 50 %. ČANAK i sur. (2018.) su tijekom istraživanja mikrobiološke populacije u svježoj ribi (lubin) i školjkašima (dagnje i kamenice) iz južnog Jadrana dokazali *Vibrio* spp. u pet (33,3 %) od 15 obrađenih uzoraka. Bakterija *V. cholerae* izdvojena je iz uzoraka crijeva i želuca jednog lubina, a iz četiri uzorka škrga, probavne žlijezde i želuca dagnji i kamenica izdvojena je vrsta *V. parahaemolitycus*.

RIPABELLI i sur. (1999.) su pretražili 62 uzorka dagnji izlovljenih na odobrenim uzgajalištima na talijanskom području Jadranskog mora te dokazali prisutnost bakterija *V. alginolyticus* u 32,2 % uzoraka, *V. vulnificus* u njih 17,7 %, *V. cincinnatiensis* u 3,2 % uzoraka te *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* i *V. cholerae* non-O1 u 1,6 % uzoraka. U Jonskom moru (Tarantski zaljev, Mar Piccolo) CAVALLO i STABILI (2002.) su utvrdili prosječne vrijednosti broja bakterija uzgojivih vibrija u morskoj vodi $5,6 \times 10^1$ cfu/ml, te u dagnjama $4,0 \times 10^4$ cfu/g. Kao najčešće izdvojenu vrstu iz roda *Vibrio* u morskoj vodi u Italiji autori navode bakteriju *V. alginolyticus*.

OTTAVIANI i sur. (2005.) su utvrdili prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus* u 35 od 144 pretraženih uzoraka dagnji porijeklom iz odobrenih uzgajališta na području Jadranskog mora (središnja Italija). Od navedenih izolata, jedan je bio pozitivan na prisutnost

tdh gena, a tri na *trh* gen. Rezultati trogodišnjeg istraživanja pojavnosti bakterija *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* i mikroorganizama fekalnog podrijetla u dagnjama u maloprodaji (NORMANNO i sur., 2006.) u regiji Puglia, Italija, pokazali su da je od 600 pretraženih uzoraka *V. parahaemolyticus* prisutan u njih 47 (7,83 %), a *V. vulnificus* u 17 (2,83 %) uzoraka.

Za razliku od dotadašnjih istraživanja na dagnjama iz Jadranskog mora, VERNOCCHI i sur. (2007.) su utvrdili prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus* u uzorcima pretraženima u travnju 2002., te siječnju i veljači 2003. godine. U razdoblju od lipnja 2006. do lipnja 2007. godine, DI PINTO i sur. (2008.) pretražili su 144 uzorka dagnji iz različitih centara za pročišćavanje školjkaša na jugu Italije. Od 47 suspektних izolata s hranjivih podloga, potvrdili su njih 12 kao bakteriju *V. parahaemolyticus* biokemijskom identifikacijom, a devet od navedenih 12 je potvrđeno molekularnom PCR metodom, pri čemu je jedan izolat detektiran tijekom zimskih mjeseci.

Od svibnja 2011. do kolovoza 2012. godine SUFFREDINI i sur. (2014.) su pretražili 147 uzoraka različitih školjkaša porijeklom iz dvije regije, Veneto i Sardinija. Bakteriju *V. parahaemolyticus* dokazali su u 56,7 % uzoraka iz Sardinije, te u 27,5 % uzoraka iz Veneta pri čemu su utvrdili prisutnost potencijalno patogene bakterije *V. parahaemolyticus* u šest uzoraka, što je uključivalo tri *tdh* pozitivna i tri *trh* pozitivna izolata.

Prvi dokaz prirodno prisutne bakterije *V. vulnificus* u uzorcima morske vode i školjkašima na području Španjolske bio je u proljeće 1996. (COVADONGA i sur., 1998.) dok je prisutnost iste bakterije u kanalizacijskim vodama, školjkašima i morskoj vodi na području Valencije u Španjolskoj dokazana 2009. godine (CANIGRAL i sur., 2009.).

Prvi dokazani slučaj oboljenja ljudi direktno povezan s konzumacijom školjkaša u Španjolskoj (Galicija) bio je 1999. godine (LOZANO-LEON i sur., 2003.). U uzorcima stolice oboljelih dokazana je prisutnost bakterije *tdh+* *V. parahaemolyticus*, što je ujedno značilo prvu potvrdu prisutnosti tog patogena u morskom okolišu Europe.

Do 2015. godine, EFSA-ini godišnji izvještaji nisu razlučivali *Vibrio* vrste kao pojedinačne uzročnike oboljenja u ljudi, već su ih svrstavali u kategoriju "ostalih bakterijskih uzročnika", da bi u izvještaju za 2015. godinu evidentirali četiri epidemije u Francuskoj s 29 oboljelih osoba (EFSA/ECDC, 2016.).

U EFSA-inom izvješću za 2019. godinu navode se četiri epidemije uzrokovane vibrijima u Francuskoj i Italiji, s tim da je uzročnik identificiran kao *V. parahaemolyticus* u Francuskoj, dok za Italiju podaci ne postoje (ANONIMNO, 2021.). Isto izvješće za 2018. godinu navodi deset epidemija uzrokovanih bakterijom *V. parahaemolyticus* u Španjolskoj i Francuskoj (ANONIMNO, 2019.). U izvješću za 2017. godinu evidentirane su tri epidemije s više od 60 oboljelih u Francuskoj a uzrokovane vrstom *V. parahaemolyticus* (ANONIMNO, 2018.). Tijekom 2016. godine nije bilo evidentiranih epidemija uzrokovanih s *Vibrio* spp. na području Europske Unije.

2.5. Globalna rasprostranjenost *Vibrio* spp.

OKUDA i sur. (1997.) izvijestili su o aktivnom nadzoru pacijenata u Kalkuti, Indija, hospitaliziranih radi infekcije bakterijom *V. parahaemolyticus*. Početkom veljače 1996. godine utvrdili su značajno povećanje broja oboljelih. Ispitujući izolate ustanovili su da ih 50 - 80 % pripada O3:K6 serovaru, te da su svi *tdh*+ i *trh*-. Nakon pojave pandemijskog klona bakterije *V. parahaemolyticus* O3:K6 1996. godine u jugoistočnoj Aziji, isti uzročnik je dokazan 1998. godine u Južnoj Americi, u Čileu (GONZÁLEZ-ESCALONA i sur., 2005.), gdje je na području gradova Puerto Montt i Antofagasta prouzročio oboljenje oko 1500 ljudi. CORDOVA i sur. (2002.) povezuju pojavu oboljenja ljudi u gradu Antofagasta s konzumacijom školjkaša i dokazuju prisutnost istog uzročnika u fecesu ljudi i školjkašima. Pretpostavljaju da je pojava patogenog uzročnika povezana s klimatološkim fenomenom El Niño koji je potaknuo "bujanje" bakterija u Antofagasti. Pandemijski soj je ostao prisutan na području Čilea narednih godina, da bi tijekom ljeta 2006. godine opet došlo do pojave masovnog oboljenja u Puerto Monttu (FUENZALIDA i sur., 2007.), dok je u Antofagasti pojava bolesti bila rijetka. Specifičnost ove pojave je u nižoj temperaturi mora u Puerto Monttu koja ljeti ne prelazi 18 °C u odnosu na Antofagastu, gdje je temperatura mora za 5 °C viša, a pojavnost *V. parahaemolyticus* je u pravilu ovisna o višoj temperaturi mora. Pretražujući uzorke školjkaša s ta dva područja, ustanovljeno je da u uzorcima iz Antofagaste niti jedan nije sadržavao bakteriju *V. parahaemolyticus*, dok je u uzorcima s drugog područja njih 50 % bilo pozitivno na *tdh*+ gen (pandemijski soj O3:K6).

Od 60-ih godina prošlog stoljeća, bakterija *V. parahaemolyticus* je jedan od najznačajnijih patogena koji se prenose hranom, da bi pandemijski soj O3:K6 prouzročio veliku epidemiju u Japanu, u razdoblju od 1997. do 2001. godine (HARA-KUDO i sur., 2012.). Istraživanjem velikog broja uzoraka morskih plodova utvrđena je stalna prisutnost pandemijskog soja bakterije uz značajno smanjenje broja oboljelih. Autori pretpostavljaju da navedeno smanjenje broja oboljelih nije posljedica smanjene kontaminacije patogenim sojem, već je posljedica poboljšanih higijenskih postupaka tijekom distribucije školjkaša sve do konzumacije. Također, navode da je učinkovita pohrana na temperaturi manjoj od 10 °C uz primjenu mikrobioloških standarda koji propisuju odsutnost bakterije *V. parahaemolyticus* u 25 g kuhanih plodova, odnosno manje od 100 MPN/g morskih plodova namijenjenih za konzumaciju u sirovom stanju.

WU i sur. (2014.) sumiraju podatke za razdoblje od 2003. do 2008. godine za Kinu (12 provincija), gdje su ustanovljena 322 slučaja epidemije gastroenteritisa prouzročenog bakterijom *V. parahaemolyticus* s 9041 oboljelim, od čega je njih 3948 hospitalizirano, što ukazuje na težinu simptoma bolesti. Dokazano je da je najčešći razlog pojave bolesti bila križna kontaminacija gotove hrane s nekuhanim morskim plodovima, prvenstveno u toplijem dijelu godine. U istraživanju provedenom u razdoblju od prosinca 2008. do studenoga 2009. godine, na uzorcima iz maloprodaje u istočnim priobalnim provincijama Kine, ZHAO i sur. (2011.) prijavili su 172 izolata *V. parahaemolyticus* od kojih su dva bila *tdh*+ i pet *trh*+. Koristeći MPN metodu utvrđena je sezonalno ovisna razlika u broju bakterija.

LEE i sur. (2008.) navode bakteriju *V. parahaemolyticus* kao jednu od vodećih uzročnika bolesti koje se prenose hranom u Republici Koreji. Istražujući prisutnost navedene bakterije na 72 uzorka kamenica, prikupljenih od travnja do prosinca, pronađeno je 48 pozitivnih uzoraka, od kojih je samo jedan bio *trh*+

RAGHUNAT i sur. (2008.) ističu bakteriju *V. parahaemolyticus* kao uzročnika približno 10 % gastroenteritisa u Indiji. Koristeći metodu kolonijalne hibridizacije odredili su granicu detekcije metode od 10 cfu/g odnosno 100 cfu/g, ovisno o izabranom razrjeđenju. U 48 od 83 uzorka utvrdili su više do 10^3 cfu/g bakterije *V. parahaemolyticus*, a u deset od 83 uzorka više od 10^4 cfu/g iste bakterije. Od ukupno 68 pozitivnih uzoraka, ustanovljeno je osam *tdh* + i 26 *trh*+ izolata bakterije *V. parahaemolyticu*.

Prateći promjene u broju bakterije *V. parahaemolyticus* na Tajvanu, YU i sur. (2013.) su utvrdili prisutnost te bakterije u 77,5 % uzoraka vode, 77,5 % uzoraka sedimenta, 70,5 % uzoraka kamenica i 68,8 % uzoraka kućica, s tim da je broj bakterija u školjkašima bio značajno veći ($1,33 \log \text{ cfu/g}$) u odnosu na ustanovljeno u uzorcima sedimenta ($1,04 \log \text{ cfu/g}$) odnosno vode ($0,02 \log \text{ cfu/g}$).

2.6. Klimatske promjene

Svjedoci smo pojave globalnog zatopljenja o čemu se govori u svim sferama ljudskog postojanja. S gledišta sigurnosti hrane i školjkaša kao hrane, globalno zatopljenje i klimatske promjene imaju značajan utjecaj na dinamiku i rasprostranjenost potencijalno patogenih halofilnih vibrija u područjima u kojima nisu povijesno dokazani kao uzročnici oboljenja ljudi.

Pojava bolesti uzrokovanih vibrijama prije je bila ograničena na tropska i suptropska područja, zemlje u razvoju s netretiranim kanalizacijskim vodama, te područja u kojima je tradicionalno uvriježena konzumacija sirovih školjkaša i drugih morskih plodova.

Korištenjem dugoročnih podataka o površinskoj temperaturi Baltičkog mora, ustanovljeno je do tad nezabilježeno povećanje temperature od 0,063 °C do 0,078 °C godišnje, što na stoljetnom nivou iznosi 6,3 °C do 7,8 °C (BAKER-AUSTIN i sur., 2012.). Navedeno zagrijavanje podudara se s neočekivanim pojavama infekcija s *Vibrio* spp. na sjeveru Europe, prvenstveno na području uz Baltičko more, pri čemu brojevi i distribucija slučajeva korespondiraju s prostornim i vremenskim pikovima površinske temperature mora. Autori navode da je to jedan od prvih dokaza da antropogena promjena klime dovodi od pojave oboljenja uzrokovanih s *Vibrio* spp. u umjerenim područjima kroz utjecaj na rezidentne bakterijske zajednice, implicirajući da taj proces utječe na preoblikovanje distribucije zaraznih bolesti na globalnom nivou.

Prema Europskoj agenciji za okoliš globalno povišenje površinske temperature mora je jedan od najvažnijih fizikalnih pokazatelja promjene klime. Povećanje površinske temperature mora na području Europe raste 4 - 7 puta brže tijekom zadnjih desetljeća u odnosu na svjetske oceane (LE ROUX i sur. 2015.). To povećanje je povezano s pojavom oboljenja u ljudi uzrokovanih s *V. cholerae* non-O1 non-O139, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus*. Također je ustanovljena povećana učestalost pojave masovnih uginuća u morskih životinja. LE ROUX i sur. (2015.) zaključuju da povećana učestalost oboljenja vibrijama ima direktan utjecaj na ljude, ali i indirektan, smanjujući sigurnost morske hrane i zdravlje ekosistema.

Na području Švedske i Finske, 2014. godine je zabilježeno 89 slučajeva infekcije *Vibrio* vrstama što je značajno više u odnosu na do tada prijavljene slučajeve u sjevernoj

Europi (BAKER-AUSTIN i sur., 2016.). Pojava oboljenja vezana je uz neuobičajeno visoke temperature mora u srpnju i kolovozu, gdje je evidentirana temperatura bila nekoliko Celzijevih stupnjeva viša od prethodno najviših temperatura evidentiranih ranih 1980-ih godina.

BAKER-AUSTIN i sur. (2017.) navode četiri značajke pripadnika roda *Vibrio* koje ih čine pogodnima za korištenje kao "barometra" klimatskih promjena. To su osjetljivost na temperaturu (svi pripadnici roda jako dobro rastu pri temperaturama iznad 15 °C); brzo umnažanje (u povoljnim uvjetima vrijeme umnažanja je 8 do 9 minuta); "neželjeni posjetitelji" (pojava oboljenja u područjima koja povijesno nisu povezana s *Vibrio* infekcijama, kao što su sjeverna Europa, Aljaska, Čile, sjeveroistočno područje SAD), te izloženost infekciji – kada i gdje (posebnost vibrija je u činjenici da imaju više mogućnosti ulaska u organizam, i to putem hrane i izlaganjem kontaminiranoj vodi, što može biti od koristi za otkrivanje izvora zaraze).

2.7. Zakonodavni okvir

Zakonodavstvo Europske unije (Uredba (EZ) 853/2004) zahtijeva da školjkaši u trenu prodaje budu živi ili odgovarajuće prerađeni, bespriječnih senzornih značajki, unutar dozvoljenih granica prisutnosti biotoksina te da udovoljavaju Uredbi (EZ) 2073/2005 s obzirom na broj bakterija *Escherichia coli*.

U Republici Hrvatskoj, praćenje kakvoće školjkaša sustavno se provodi prema Planu praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje školjkaša (ANONIMNO, 2020.) a temelji se na određivanju prisutnosti bakterije *E. coli* kao indikatora mikrobiološkog onečišćenja, biotoksina, teških metala i benzo(a)pirena. U slučajevima kada školjkaši ne udovoljavaju propisanim kriterijima, određuje se postupanje u smislu zabrane izlovljavanja / obvezno pročišćavanje / toplinska obrada ovisno o dostupnim mogućnostima.

2.8. Mogućnost primjene različitih tehnoloških postupaka s ciljem uklanjanja potencijalno patogenih vibrija

2.8.1. Pročišćavanje školjkaša

Školjkaši su vrlo kvalitetna namirnica visoke hranjive vrijednosti, bogat izvor mikroelemenata. Međutim, uobičajeni način konzumacije sirovih ili neznatno toplinski obrađenih školjkaša otvara mogućnost unosa patogenih mikroorganizama i razvoj bolesti u potrošača.

Komercijalno su vrijedniji živi školjkaši, koji se pročišćavaju u centrima za pročišćavanje ili postupkom ponovnog polaganja, kako bi zadovoljili propisane kriterije.

Već je istaknuto da *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi, pogotovo rizičnih skupina. Uzgojna i izlovna područja istarskoga akvatorija, većinom su klasificirana u zonu A, što znači da se školjkaši stavljaju na tržište bez potrebe za pročišćavanjem. Postupkom pročišćavanja se u roku od 12 do 24 sata u većini slučajeva, školjkaši očiste od bakterije *E. coli*, dok je za smanjivanje broja bakterija *Vibrio* spp. potrebno sedam do osam dana (LOPEZ-JOVEN i sur., 2011.). MARINO i sur., (2005.) istražujući učinkovitost pročišćavanja nakon umjetne kontaminacije dagnji s bakterijama *E. coli*, *V. cholerae* i *Enterococcus durans*, ustanovili su da je najučinkovitija temperatura pročišćavanja za bakteriju *E. coli* 21 °C, pri kojoj se nakon 72 sata ista bakterija ne može dokazati. Međutim, pročišćavanjem na istoj temperaturi, bakterija *V. cholerae* je nađena i nakon 168 sati. Mogućnost pročišćavanja kamenica nakon umjetne kontaminacije bakterijama *V. parahaemolyticus* prikazana je u istraživanju SUREERATA i sur. (2012.). Navedeni autori su ustanovili da je najučinkovitija temperatura vode za pročišćavanje školjkaša u rasponu od 7 °C do 15 °C tijekom pet dana. Istraživanjem školjkaša koji su prošli postupak pročišćavanja, autori DI PINTO i sur. (2008.) su dokazali prisutnost *V. parahaemolyticus* klasičnom mikrobiološkom metodom u 12 od 144 uzorka. Molekularnom analizom potvrdili su devet od 12 izolata, pri čemu su u tri od njih devet potvrdili prisutnost gena *tdh*. Uz navedeno, proveli su i izolaciju bakterijske DNA iz bujonskih kultura koje su pokazale sumnjiv rast na TCBS-u, i utvrdili prisutnost *V. parahaemolyticus* u 23 od 47 uzoraka, uz detekciju gena *tdh* u sedam od 23 uzorka.

2.8.2. Ostali tehnološki postupci

Osim pročišćavanja u centrima za pročišćavanje, mnogi su autori istraživali i druge tehnološke mogućnosti kondicioniranja školjkaša i to, tretiranje ekstraktima zelenog čaja (XI i sur., 2012.), X - zrakama (MAHMOUD, 2009.), klorovim dioksidom (WANG i sur., 2010.), visokim salinitetom (LARSEN i sur., 2013.), ugljičnim dioksidom (MEUJO i sur., 2010.), visokom temperaturom (LIEW i sur., 1998.,) primjenom visokog hidrostatskog tlaka uz različite uvjete temperature (KURAL i HAIQIANG, 2008.; KURAL i sur. 2008.; MA i Y.-C. SU, 2011.; PHUVASATE i Y.-C. SU, 2015.). Općenito se navedeni postupci mogu podijeliti na one koji omogućavaju školjkašima preživljavanje tretmana, i one koji se mogu primijeniti samo na prerađevine. RONHOLM i sur. (2016.) sumiraju postupke za produžavanje roka trajanja i smanjenje kontaminacije *Vibrio* vrstama u različitim morskih plodova. Tako navode učinkovite tretmane ozonom, prirodne organske tretmane (esencijalnim uljem timijana, origana, ružmarina, te ekstraktima čaja), tretiranje bakteriofagima, visokim hidrostatskim pritiskom, i ionizirajućim zračenjem. Također, navode da svaki od ovih postupaka ima različite utjecaje na senzorska svojstva, pri čemu tretiranje visokim hidrostatskim tlakom rezultira promjenom boje tkiva kamenica, dok ostali postupci, osim primjene organskih tretmana, ne rezultiraju promjenom senzorskih svojstava. Što se tiče sigurnosti primjene ovih postupaka, jedino tretiranje ozonom ostavlja rezidue (CO_2 i H_2O), dok su ostali postupci sigurni. Za primjenu ionizirajućeg zračenja autori navode da je odobreno u nekoliko država, uključujući SAD, Veliku Britaniju i Francusku.

2.9. Metode dokaza *Vibrio* spp.

2.9.1. Metode za dokazivanje prisutnosti, brojanje i biokemijsku identifikaciju potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

Postoji niz različitih metoda koje se primjenjuju za dokazivanje prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp. Važeće izdanje norme HRN EN ISO 21872-1:2017 Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za određivanje *Vibrio* spp. – 1. Dio: Dokazivanje prisutnosti potencijalno enteropatogenih *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* i *Vibrio vulnificus*, (ANONIMNO, 2017.) u odnosu na prethodno, uključuje primjenu dviju temperatura za inkubaciju bujonskih kultura, čime se poboljšava otkrivanje prisutnosti bakterije *V. vulnificus*.

Razvojem metoda za dokazivanje prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp. utvrđena je važnost tekućeg medija koji se koristi za razrjeđivanje i namnažanje uzoraka. Tako su AZANZA i sur. (1996.) ustanovili da je 1 %-tna otopina peptona s dodatkom 3 % NaCl bolji diluent u odnosu na puferiranu slanu peptonsku otopinu. Norma ISO 8914:1990 (ANONIMNO, 1990.) propisuje korištenje alkalne slane peptonske vode (ASPV), kao i HRN EN ISO 21872-1:2017 (ANONIMNO, 2017.). Bolji učinak izolacije i detekcije bakterije *V. parahaemolyticus* *tdh/trh* + postignut je korištenjem bujona s dodatkom žučnih soli i pH 6,0 (RAGHUNATH i sur., 2009.). Autori objašnjavaju bolju učinkovitost navedenog bujona činjenicom da se patogena bakterija *V. parahaemolyticus* mora bolje prilagoditi uvjetima u probavnom sustavu čovjeka, koji uključuju prisutnost žučnih soli i niskog pH. Zahvaljujući rezistenciji bakterije *V. parahaemolyticus* na antibiotik polimiksin B, razvijen je slani bujon s polimiksinom B, pH 7,4 koji je omogućio postizanje boljih rezultata kada se koristio kao drugi bujon za namnažanje, jer je smanjio mogućnost razvoja kompetitivne mikroflore (BLANCO-ABAD i sur. 2009.).

Krute hranjive podloge koje se koriste za izolaciju bakterija *Vibrio* spp. sadrže različite komponente kojima je svrha inhibicija rasta neželjene mikroflore te poticanje rasta ciljnih mikroorganizama. Norma HRN EN ISO 21872-1:2017 (ANONIMNO, 2017.) propisuje korištenje tiosulfat-citrat-saharoza agara sa žučnim solima (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar - TCBS agara), te drugu hranjivu podlogu po izboru laboratorija. Problem s TCBS agarom je slaba selektivnost podloge na koju su ukazali LOTZ i sur. (1983.). Navode da je od ispitivanih 188 izolata njih čak 177 dobro raslo na TCBS agaru, pri čemu je čak devet

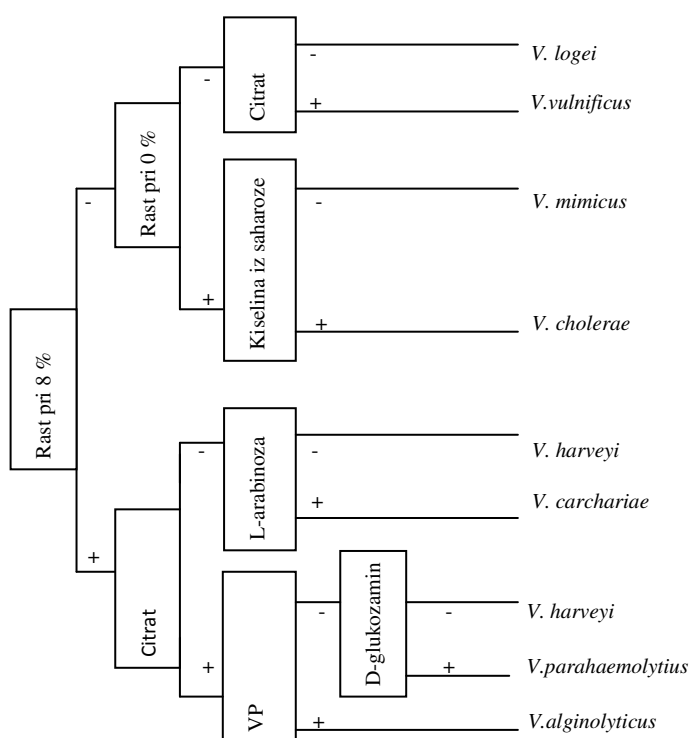
različitih bakterijskih vrsta pokazalo rast kolonija žute boje, dok je devet vrsta poraslo zelenim kolonijama. Pojava istog izgleda kolonija *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* na TCBS agaru rezultirala je razvojem agara s dodatkom natrijevog dodecil sulfata (KITAURA i sur., 1983.) (Sodium dodecyl sulfate polymyxin B sucrose agar - SPS agar) koji omogućuje razlikovanje kolonija *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* zbog aktivnosti sulfataze *V. vulnificus*, što se na agaru očituje pojavom zone (halo) koja okružuje koloniju. Isti autori dokazali su da bakterija *V. cholerae* O1 također posjeduje sulfatazu, te se navedeni agar može uspješno koristiti za dokazivanje njene prisutnosti. Daljnjim istraživanjima utvrđena je veća selektivnost agara uz dodatak celobioze, polimiksina B i kolistina (Cellobiose Polymyxin B Colistin agar, CPC agar), koji je podržavao rast bakterijskih vrsta *V. vulnificus* i *V. cholerae* i istovremeno omogućio međusobno razlikovanje kolonija (MASSAD i OLIVER, 1987.).

HARWOOD i sur. (2004.) navode još niz agara s različitim dodacima koji podržavaju rast bakterije *V. vulnificus*. Tako spominju modificirani CPC agar (Modified CPC- mCPC) sa smanjenom koncentracijom kolistina; agar za brojanje bakterije *V. vulnificus* (*V. vulnificus* enumeration medium-VVE) s celobiozom kao izvorom ugljika i kromogenim supstratom za dokazivanje β -galaktozidaza pozitivnih kolonija bakterije *V. vulnificus*; agar za *V. vulnificus* (*V. vulnificus* agar-VVA) s celobiozom i bez antibiotika namijenjen za direktno dokazivanje bez prednamnažanja; celobioza kolistin agar (Cellobiose colistine agar - CC) agar koji je modifikacija mCPC agara i ne sadrži polimiksin B.

Uz spomenuta istraživanja koja se bave metodama dokazivanja prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp., razvijane su metode za brojanje bakterija. Metode brojanja potencijalno patogenih vibrija uključuju postupke direktnog brojanja bez namnažanja, te postupke određivanja najvjerojatnijeg broja. DE PAOLA i sur. (1988.) su uspoređivali četiri različita postupka za određivanje broja bakterije *V. parahaemolyticus*: MPN metodu (FDA); R-MPN metodu (MPN metoda poboljšana namnažanjem u triptikaza soja bujonu praćeno selektivnim namnažanjem u glukoza slanom Teepol bujonu); membransku filtraciju; te modificiranu membransku filtraciju uz uporabu hidrofobnih membrana. S obzirom na postignute rezultate, upotrijebljeni materijal i potreban rad, zaključili su da je najprihvatljivija uporaba modificirane membranske filtracije.

Biokemijska identifikacija okolišnih izolata *Vibrio* vrsta je zahtjevan postupak radi njihove velike različitosti (ALSINA i BLANCH, 1994a; 1994.b). Klinički izolati nisu toliko fenotipski različiti, te je samim tim njihova identifikacija jednostavnija. Autori predstavljaju

set biokemijskih testova koji su primjenjivi za rutinske svrhe, a prethodi im nekoliko osnovnih uvjeta koje izolati moraju zadovoljiti: rast na TCBS agaru, gram-negativni štapići, oksidaza pozitivni i fakultativni anaerobi. Početni korak u identifikaciji je određivanje arginin dihidrolaze, lizin dekarboksilaze i ornitin dekarboksilaze, čime se dobiva osam mogućih klastera, od kojih se šest podvrgavaju daljnjoj biokemijskoj identifikaciji. Potom slijede rast pri 0, 6 i 8 % NaCl, rast pri 4, 35 i 40 °C, α -ketoglutarat, amigdalina, rezistencija na ampicilin 10 μ g, arabinosa, citrat, d-glukozamin, gelatinaza, indol, l-arabinoza, luminiscencija, manitol, NO₂, rezistencija na 0/129 10 μ g, ONPG, oksidaza, salicilna kiselina, saharoza, ureaza i Voges Proskauer test. Korištenjem ključeva kako su ih autori prikazali, kroz nekoliko koraka se može doći do biokemijske identifikacije.



Shema 1. Identifikacijski ključ za klaster arginin - / lizin dekarboksilaza + / ornitin dekarboksilaza + (A-/L+/O+) (prema ALSINA i BLANCH, 1994a).

Komercijalno dostupni biokemijski testovi kao API 20E i API 20NE omogućavaju biokemijsku identifikaciju ali, u usporedbi s molekularnim metodama, ne daju uvijek pouzdane rezultate (ROBERT-PILLOT i sur., 2002., BONNIN-JUSSERAND i sur., 2017).

FAO/WHO vodič (2016.) navodi mogućnost primjene različitih metoda dokazivanja i određivanja broja bakterija *Vibrio* vrsta u odnosu na krajnji cilj koji se želi postići. Tako se za metode dokazivanja navodi da su primjenjive za: monitoring i nadziranje izlovnih područja; dobivanje osnovnih informacija o nekom području bez ikakvih prethodnih podataka; istraživanje sezonske prevalencije i identifikaciju rizičnih razdoblja kada treba provesti dodatna istraživanja; dokazivanje sukladnosti s kriterijima koji propisuju koncentraciju (primjer <100 MPN/g) ovisno o očekivanoj koncentraciji; dokazivanje sukladnosti s kriterijima koji propisuju odsutnost, npr. odsutnost u 25 g. Isti FAO/WHO vodič (2016.) navodi mogućnosti primjene metoda za brojanje bakterija u svrhu: monitoringa izlovnih područja za utvrđivanje povećanih koncentracija bakterija tijekom rizičnih vremenskih razdoblja; dokazivanja sukladnosti sa standardima koji propisuju granične vrijednosti brojeva (na primjer kada je granična vrijednost prihvatljiva); ispitivanja povezanosti infektivne doze i oboljenja tijekom istraživanja epidemija; određivanja omjera patogenih i nepatogenih bakterija *V. parahaemolyticus*; određivanja krivulje rasta i preživljavanja.

BONNIN-JUSSERAND i sur. (2017.), prikazali su rezultate istraživanja različitih autora, koji svi potvrđuju manjkavost klasičnih mikrobioloških metoda u smislu dugotrajnosti postupaka, manje specifičnosti, te ograničenja biokemijske identifikacije, koja često daje pogrešne rezultate radi velike fenotipske sličnosti različitih *Vibrio* vrsta. Prema istim autorima preporučeno je uključiti molekularne metode (PCR, qPCR, LAMP), s ciljem povećanja točnosti identifikacije. Također, navode manjkavost klasične mikrobiološke metode u smislu nemogućnosti utvrđivanja patogenosti dobivenih izolata.

2.9.2. Molekularne metode

Tijekom posljednjih tridesetak godina razvijane su različite metode s ciljem pouzdanije identifikacije *Vibrio* vrsta. Neki su autori radili na poboljšanju kulturelne mikrobiološke metode (PENDRU i sur., 2009.), dok je većina radova bazirana na razvoju i primjeni molekularnih tehnika: konvencionalni PCR (BILUNG i sur. 2005.), PCR u stvarnom vremenu - RT PCR (BEJ i sur., 1999.; BLACKSTONE i sur. 2003.; WANG i LEVIN, 2007.), multiplex PCR (LEE i sur., 2003.). U radovima autora ROSEC i sur. (2009.; 2012.) uspoređivana je primjena kulturelne mikrobiološke metode i PCR-a.

Da bi molekularne metode bile učinkovite, potrebno je izabrati odgovarajuću nukleotidnu sekvencu koja će biti reprezentativna za traženu vrstu bakterija. U svom radu LEE i sur. (1995.) su prikazali primjenu nukleotidne sekvence fragmenta pR72H kloniranog iz bakterije *V. parahaemolyticus*. Temeljem te sekvence sintetizirane su početnice VP33-VP32, te je određena osjetljivost PCR-a za čistu bakterijsku kulturu *V. parahaemolyticus* od 10 stanica. Primjena PCR-a na istom fragmentu pR72H, prikazana je u istraživanju ROBERT-PILLOT i sur. (2002.) koji su provjerili 122 izolata biokemijski identificirana kao *V. parahaemolyticus* ili *V. alginolyticus*. Utvrđeno je nepodudaranje biokemijske identifikacije i PCR-a u 11 % izolata iz morske vode. Dodatnom provjerom izolata metodom DNA-DNA hibridizacije, ustanovljeno je da neki sojevi biokemijski identificirani kao *V. alginolyticus*, pripadaju vrsti *V. parahaemolyticus*. Biokemijska identifikacija je provedena API 20E sustavom, u kojem je jedina razlikovna biokemijska karakteristika navedenih vrsta fermentacija saharoze, pri čemu većina sojeva *V. parahaemolyticus* ne fermentira saharozu, a većina sojeva *V. alginolyticus* fermentira saharozu, međutim, 11 - 25 % sojeva *V. alginolyticus* također ne fermentira saharozu.

Za potrebe identifikacije idealno je korištenje nukleotidne sekvence koja je dobro očuvana i koja odražava filogenetsku povezanost. S tim su ciljem KIM i sur. (1999.) proučavanjem *toxR* gena, koji je prethodno otkriven kao regulatorni gen za kolera-toksin operon, utvrdili postupkom DNA kolonijalne hibridizacije na 373 sojeva bakterije *V. parahaemolyticus* pozitivne rezultate. Od 290 sojeva koji nisu pripadali vrsti *V. parahaemolyticus*, postignuta su 4 pozitivna rezultata (jedan se odnosio na bakteriju *V. alginolyticus*), s tim da je hibridizacijski signal bio slabiji u odnosu na signal bakterije *V. parahaemolyticus*. Temeljem navedenog rada, pripremljene su početnice: *VpToxR* (FW): GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG, *VpToxR* (REV): ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG te uspostavljeni uvjeti za PCR (KIM i sur., 1999., ANONIMNO, 2017.).

Na temelju DNA sekvence nazvane *tdh* gen, koji kodira termostabilni direktni hemolizin TDH (NISHIBUCHI i KAPER, 1985.), sintetizirane su početnice za TDH pozitivnu bakteriju *V. parahaemolyticus* L-*tdh* (FW): GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC, R-*tdh* (REV): TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC (BEJ i sur. 1999., ANONIMNO, 2017.). U istraživanju autora BEJ i sur. (1999.) navedene su i početnice za *trh* gen: L-*trh* (FW): TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT, R-*trh* (REV): CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G (BEJ i sur. 1999., ANONIMNO, 2017.).

Identifikacija bakterije *V. cholerae* bazirana na podacima molekularnog sekvencioniranja predstavljala je izazov radi velike sličnosti s bakterijom *V. mimicus* (CHUN i sur., 1999.). Koristeći regiju koja se razlikuje u bakterije *V. cholerae* u odnosu na bakteriju *V. mimicus*, dizajnirane su početnice za *V. cholerae* *prVC* (FW): TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT G, *prVC* (REV): AGT CAC TTA ACC ATA CAA CCC G, te uspostavljeni uvjeti za PCR (CHUN i sur., 1999, ANONIMNO, 2017.)

Za identifikaciju bakterije *V. vulnificus* u umjetno kontaminiranim kamenicama, korištena je ciljana regija koja sadrži citotoksin-hemolizin gen (HILL i sur., 1991.). Temeljem nukleotidne sekvence sintetizirane su početnice: *VVH* (FW): CCG GCG GTA CAG GTT GGC GC *VVH*, (REV): CGC CAC CCA CTT TCG GGC C (HILL i sur., 1991., ANONIMNO, 2017.).

Primjena PCR protokola za određivanje prisutnosti bakterije *V. parahaemolyticus* u bujonima za namnažanje uzoraka prirodno kontaminiranih školjkaša, opisana je u radu ROSEC i sur. (2009.). Od 57 pretraženih uzoraka, kulturnim postupkom utvrđena je prisutnost tražene bakterije u tri uzorka, a PCR protokolom u njih 25, od kojih je osam bilo pozitivno na prisutnost *tdh* gena. Određujući limit detekcije u dvije razine kontaminacije (niska, 1 - 12 cfu/25 g te srednja 44 - 74 cfu/25 g) za oba postupka s tri različita soja bakterije *V. parahaemolyticus* (jedan soj *trh+* i dva *tdh+*), utvrđeno je da kulturnom metodom nije uspjelo dokazivanje za dva od tri ispitivana soja u obje razine kontaminacije, dok je PCR-om prisutnost ispitivanih bakterija dokazana u svim pretraživanim razinama kontaminacije.

ROSEC i sur. (2012.) su u proširenom istraživanju koje se nadovezuje na postupke opisane u radu iz 2009. godine, uključili ispitivanje prisutnosti bakterije *V. cholerae*, te proširili paletu uzoraka sa živim dvoljuštornim školjkašima, zamrznutim rakovima i zamrznutim ribljim filetima. Za razliku od prethodnog istraživanja, ustanovili su prisutnost *trh* gena u ukupno osam uzoraka kamenica, bez prisutnosti *VptoxR* gena. Uspoređujući rezultate postignute kulturnim i PCR postupkom, od ukupno 112 uzoraka školjkaša, u njih 32 je dokazana prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus* ISO metodom, dok je PCR postupkom dokazana u 68 uzoraka. Bakterija *V. cholerae* je dokazana u pet od šest PCR pozitivnih uzorka. U uzorcima zamrznutih rakova ustanovljena je velika podudarnost rezultata postignutih s oba postupka, bez obzira što se u zamrznutim uzorcima očekuje manji broj živih bakterija *V. parahaemolyticus*. Za navedenu podudarnost autori smatraju da je posljedicom primjene temperature od 37 °C za inkubaciju bujona za namnažanje koja se

primjenjuje za zamrznute proizvode, u odnosu na 41,5 °C koja se primjenjuje za žive školjkaše (ANONIMNO, 2017.). Za navedenu temperaturu inkubacije od 41,5 °C pretpostavljaju da je previsoka i ometa rast bakterije *V. parahaemolyticus*, radi čega ne može prerasti kompetitivnu mikrofloru (ROSEC i sur., 2012.).

2.10. Uzgoj školjkaša

2.10.1. Uzgoj i izlov dagnji

Na području istarskoga akvatorija uobičajen je uzgoj dagnji na pergolarima. Uzgoj započinje nasađivanjem mlađi u pergolar, koji je cjevasta mreža od umjetnog materijala s oknima različite veličine ovisno o veličini mlađi koja se nasađuje.



Slika 8. Mreža pergolara (foto: N. Džafić)

Pergolari se pune u dužini koja ovisi o dubini mora u koje se polaže pri čemu pergolar ne smije ležati na dnu. Napunjeni pergolar čvrsto se zatvara i postavlja na vodoravni konop razapet između plutača.



Slika 9. Uzgajalište dagnji (foto: N. Džafić)

Razmak između pojedinih pergolara je promjenjiv i usklađuje se ovisno o dotoku hranjivih tvari kako bi se svim jedinkama omogućio pristup hrani.



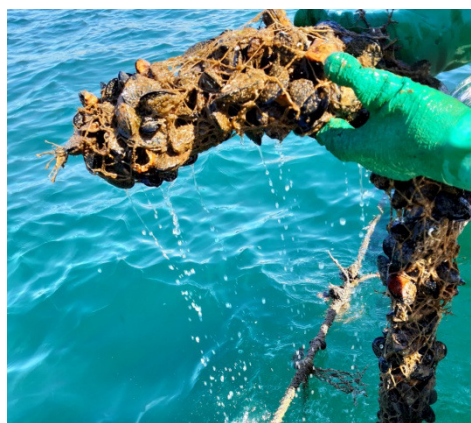
Slika 10. Konop s pergolarima
(foto N. Džafić)



Slika 11. Pergolar s nasadenim dagnjama
(foto N. Džafić)

Za postizanje komercijalne veličine, dagnja treba u prosjeku jednu i pol godinu, odnosno dva ciklusa tople vode. Tako pergolari nasađeni mlađem u proljetnim mjesecima, postignu konzumnu veličinu sljedeće godine u jesen.

Izlov dagnji uzgojenih na pergolarima započinje odabirom pergolara s dagnjama konzumne veličine.



Slika 12. Pergolar s dagnjama konzumne veličine (foto: N. Džafić)

Pergolari se vade iz mora te se dagnje ručno ili strojno oslobađaju iz uzgojnih busena. Istovremeno se peru čistom morskom vodom te sortiraju.



Slika 13. Odvajanje dagnji iz uzgojnih busena (foto: N. Džafić)



Slika 14. Izlazni otvor uređaja za pranje i sortiranje (foto: N. Džafić)

Dagnje sortirane za konzum se pakira u mrežice za prodaju. Prilikom sortiranja, odvaja se mlađ u različitim veličinama te se ponovo nasađuje za daljnji uzgoj.



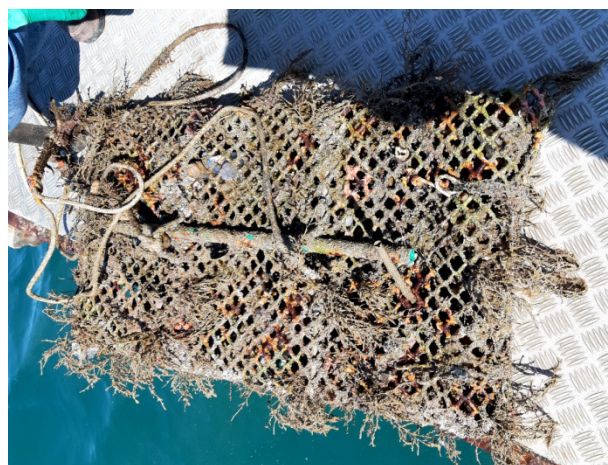
Slika 15. Dagnje pakirane u mrežice za prodaju (foto: N. Džafić)

2.10.2. Uzgoj i izlov kamenica

Uobičajeni uzgoj kamenica u istarskom akvatoriju je u košarama. Košare su rađene od čvrste mrežaste žice zatvorene sa svih strana, pri čemu se na jednoj strani nalaze kopče za otvaranje i zatvaranje košare. Prikupljena mlađ stavlja se u košare i zatvori, a košare se konopom objese na nosače. Uzgoj kamenica do konzumne veličine traje dvije do tri godine. Tijekom uzgojnog razdoblja košare s kamenicama se redovito provjeravaju, te se izdvajaju uginule jedinke.



Slika 16. Košara za uzgoj kamenica
(foto: N. Džafić)



Slika 17. Košara s kamenicama (foto N. Džafić)

Izlov kamenica uzgojenih u košarama je jednostavan, iz košare se istresu kamenice, operu čistom morskom vodom i pakiraju u kutije za prodaju.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Ciljevi ovog rada obuhvatit će sustavno istraživanje prisutnosti bakterijskih vrsta *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* i *V. vulnificus* u školjkašima neposredno nakon izlova, primjenom standardizirane mikrobiološke metode i molekularnih postupaka (PCR). PCR postupci će se primijeniti za identifikaciju bakterijskih izolata kao i za dokaz gena za kodiranje TDH i TRH toksina bakterije *V. parahaemolyticus*. Istovremeno, uz primjenu standardizirane mikrobiološke metode, primijenit će se i PCR postupci za dokazivanje potencijalno patogenih *Vibrio* spp. u uzorcima školjkaša iz bujonskih prednamnažanja.

Pretpostavka je istraživanja da će pojavnost patogenih *Vibrio* vrsta biti uvjetovana lokalitetom i sezonom uzorkovanja školjkaša, kao i da će molekularni postupci dokazivanja prisutnosti patogenih *Vibrio* vrsta rezultirati većim brojem pozitivnih uzoraka u odnosu na kulturelnu metodu.

Rezultati ovog istraživanja pružit će izvorne znanstvene spoznaje o prevalenciji bakterija roda *Vibrio* u školjkašima istarskoga akvatorija, omogućiti utvrđivanje patogenih *Vibrio* vrsta i ukazati na područja i godišnja doba povećanog rizika za konzumaciju školjkaša. Nadalje, ostvareni rezultati moguće će ukazati i na potrebu sustavnog praćenja prisutnosti bakterija *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* i *V. vulnificus* u moru i školjkašima za konzumaciju. Uz navedeno, primjena različitih ispitnih metoda ukazat će na mogućnost odabira jednostavnijeg i bržeg, te isplativijeg postupka za osiguranje mikrobiološke ispravnosti školjkaša. Dobivene spoznaje ukazat će na zoonotski potencijal školjkaša te poslužiti u poticanju nadzora sigurnosti hrane.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorci

Istraživanje prisutnosti potencijalno patogenih vrsta roda *Vibrio* u školjkašima sjevernog Jadrana je obuhvatilo ekonomski najznačajnije vrste dvoljušturnih školjkaša, dagnje (*Mytilus galloprovincialis*), kamenice (*Ostrea edulis*) i kapice (*Aequipecten opercularis*) te ostale, manje značajne vrste. Uzorci su izuzimani u okviru provedbe "Plana praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša" (u daljnjem tekstu: Plan) (ANONIMNO, 2017.; 2018.; 2019.; 2020.), pri čemu su za naše istraživanje iskorišteni preostali dijelovi uzoraka nakon rutinskih analiza. Po sakupljanju, školjkaši su pakirani na način koji uzorak osigurava od vanjske i međusobne kontaminacije te su u rashladnim kutijama transportirani pri temperaturi $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi pristigli u laboratorij u roku koji osigurava početak analize unutar 24 sata od uzorkovanja. Uzorci su prikupljeni u razdoblju od veljače 2017. do ožujka 2020. godine, a ukupno je pretraženo njih 632 (Tablica 1.). Najveći broj uzoraka prikupljen je tijekom 2019. godine, a najmanji 2020. godine.

Tablica 1. Broj prikupljenih i analiziranih uzoraka školjkaša po godinama

Godina	n	Udio u ukupnom broju uzoraka, %
2017	181	28,64
2018	184	29,11
2019	213	33,70
2020	54	8,54
Ukupno	632	100

U tablici 2. prikazan je broj pretraženih uzoraka prema vrstama školjkaša. Najbrojnija vrsta pretraženih školjkaša su dagnje (53,01 %), a najmanje zastupljena vrsta su rumenke (3,96 %).

Tablica 2. Broj pretraženih uzoraka prema vrstama školjkaša

Vrsta uzorka	n	Udio u ukupnom broju uzoraka, %
Dagnje*	335	53,01
Kamenice*	58	9,18
Kapice*	85	13,45
Kunjke*	89	14,08
Prnjavice*	40	6,33
Rumenke*	25	3,96

*Živi školjkaši

4.2. Geografska područja za uzgoj i izlov školjkaša

Jadransko more dio je Sredozemnog mora s kojim dijeli neke sličnosti ali po mnogim svojstvima je posebno. Jadran je more male dubine, najpliće je na krajnjem sjeveru, koji je zasut nanosima rijeka Pad (Po). Na fizikalna svojstva Jadranskog mora utječu atmosfera, kopnene vode te međudjelovanje Jadrana i Jonskog mora uz topografiju bazena kao kontrolirajućeg čimbenika. Opće površinsko strujanje odvija se u smjeru suprotnom od kretanja kazaljke sata – voda utječe kroz Otrantska vrata duž istočne obale Jadrana prema sjeveru, a istječe uz talijansku obalu prema jugu. Postoji i nekoliko poprečnih tokova, a u toplom dijelu godine prisutni su manji kružni tokovi suprotnog smjera od glavne struje. Površinska slanost je u jugoistočnom dijelu viša od 38 ‰, a u sjeverozapadnom dijelu pada na manje od 35 ‰, pri čemu je podložna vremenskim promjenama: godišnjim, međugodišnjim i dugogodišnjim. Primitak vode oborinama i kopnenim dotocima nadmašuje gubitak isparavanjem, što znači da se sol unosi u Jadran iz Sredozemnog mora. Površinska temperatura mora najniža je u veljači i ožujku, a najviša u kolovozu. Kao što slanost mora opada od juga prema sjeveru, tako i temperatura mora opada po istoj vertikali, što znači da se toplina unosi u Jadran i predaje u atmosferu. Geografski položaj Jadranskog mora određuje njegovo veliko prometno značenje, pri čemu se na krajnjem sjeveru nalaze tri glavna lučka središta, Trst i Venecija s talijanske strane i Rijeka s hrvatske strane Jadrana. Preko ove tri luke odvija se najveći dio jadranskog pomorskog prometa i glavnina tranzita (izvor: <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=28478>).

U istraživanja su uključeni uzorci živih školjkaša uzgojenih i izlovljenih na području Istarske županije (sjeverni Jadran). Školjkaši uzorkovani na proizvodnim područjima za uzgoj ili izlov živih školjkaša, prikupljani su jednom mjesečno, uvijek s istih lokacija. U moru istarskoga akvatorija Planom (ANONIMNO, 2017.; 2018.; 2019.; 2020) je određeno šest uzgojnih i dva izlovna područja. Za svako proizvodno područje definirane su granice područja, referentne vrste praćenja mikrobiološkog onečišćenja te geografske točke uzorkovanja. Prema navedenom Planu, u istarskome akvatoriju uzorci su uzorkovani na devet točaka u uzgojnim područjima i devet točaka s izlovnih područja.



Slika 18. Geografske lokacije uzgojnih i izlovnih područja (preuzeto s www.caps2.eu/caps2/)

Tablica 3. Ukupan broj uzoraka školjkaša po točkama uzorkovanja

Lokacija	n	Udio u ukupnom broju uzoraka, %
L1 - I	34	5,38
L2 - I	28	4,43
L3 - Z	38	6,01
L4 - Z	38	6,01
L5 - Z	38	6,01
L6 - I	34	5,38
L7 - I	34	5,38
L8 - Z	38	6,01
L9 - I	34	5,38
L10 - Z	36	5,70
L11 - Z	38	6,01
L12 - Z	37	5,85
L13 - Z	32	5,06
L14 - Z	33	5,22
L15 - Z	37	5,85
L16 - Z	35	5,54
L17 - Z	33	5,22
L18 - Z	35	5,54
UKUPNO	632	100

Lokacije L1 - I, L2 - I, L6 - I, L7 - I i L9 - I nalaze se na istočnoj obali Istre, a ostale lokacije su smještene na zapadnoj obali Istre.

4.3. Metode rada

Ovim je istraživanjem obuhvaćeno:

1. dokazivanje prisutnosti bakterija roda *Vibrio* u školjkašima istarskoga akvatorija
2. obrada podataka o vremenskim uvjetima i temperaturi mora u vrijeme uzorkovanja

U mikrobiološkim ispitivanjima i dokazu bakterija *Vibrio* spp. primijenjene su sljedeće metode:

- HRN EN ISO 21872-1:2017 Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za određivanje *Vibrio* spp. – 1. dio: Dokazivanje prisutnosti potencijalno enteropatogenih *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* i *Vibrio vulnificus*.

Biokemijska identifikacija suspektih kolonija *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* i *V. vulnificus*.

- Molekularna dijagnostika (Polymerase Chain Reaction; PCR)

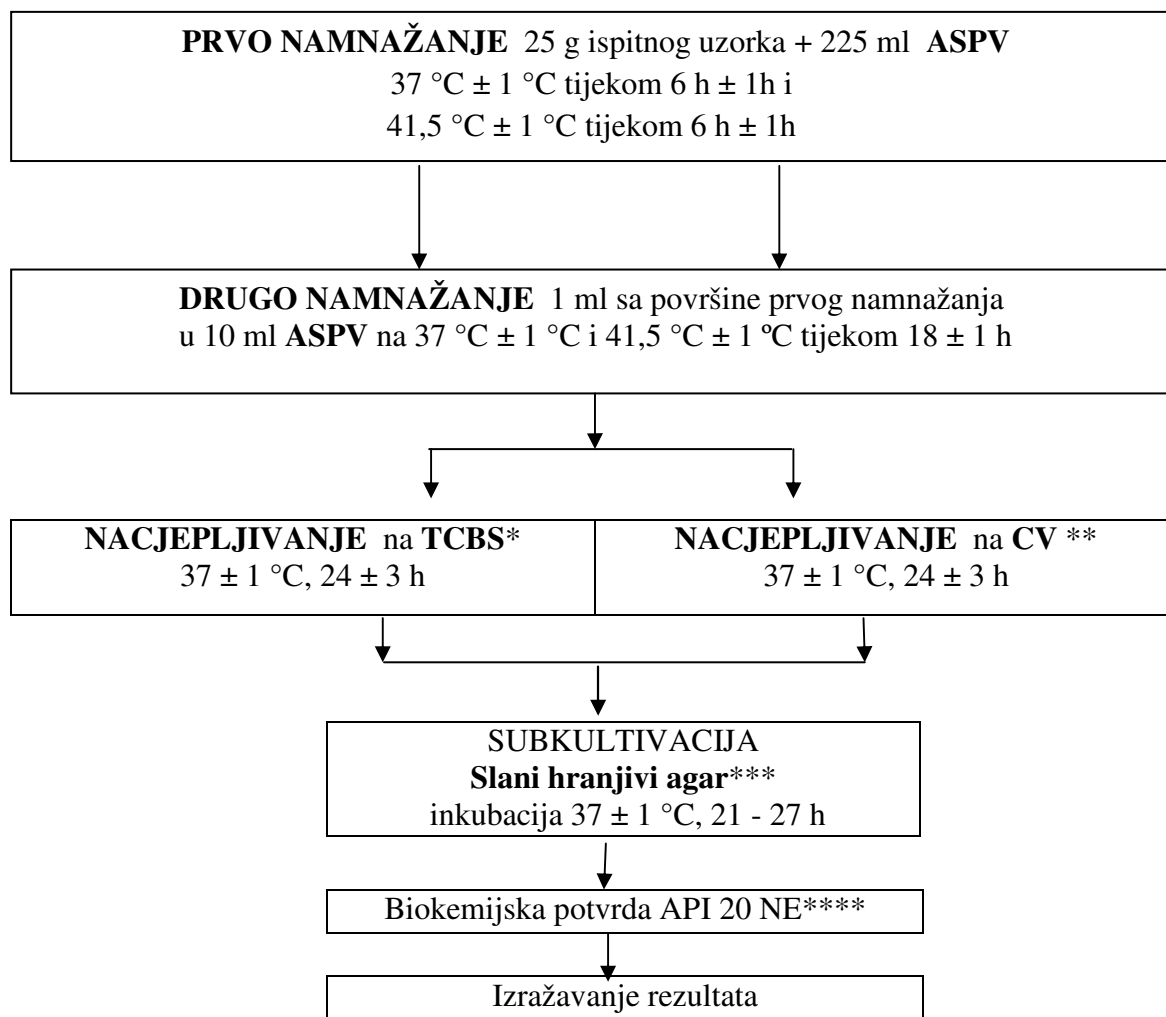
Potvrda izolata PCR tehnikom. Testiranje izolata bakterije *V. parahaemolyticus* na prisutnost gena za kodiranje toksina *tdh* i *trh*.

Pretraživanje uzoraka nakon prednamnažanja PCR tehnikom.

4.3.1. Metoda za dokazivanje prisutnosti i biokemijsku identifikaciju potencijalno enteropatogenih *Vibrio* spp.

Izdvajanje i dokazivanje prisutnosti potencijalno enteropatogenih *Vibrio* spp. provedeno je kroz više sukcesivnih faza. Vrste roda *Vibrio*, u uzorcima živih školjakašâ uobičajeno su prisutne u vrlo malom broju, zbog čega je neophodna primjena prednamnažanja pri odgovarajućim temperaturama. S obzirom da je istraživanje započelo prije objavljivanja jedinstvene norme HRN EN ISO 21872-1:2017, Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za određivanje *Vibrio* spp. – 1. Dio: Dokazivanje prisutnosti potencijalno enteropatogenih *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* i *Vibrio vulnificus*, tijekom 2017. i 2018. godine prednamnažanje uzoraka je obavljeno pri temperaturi 41,5 °C tijekom 6 sati, dok je od 2019. godine uz navedenu primijenjena i temperatura prednamnažanja od 37 °C.

Po dostavi uzoraka u laboratorij, školjkaši su oprani čistom, tekućom vodom, te otvoreni u aseptičnim uvjetima. Za ispitivanje je prikupljeno tkivo i međuljuštarna tekućina u količini od 25 g.



*Tiosulfat-citrat-saharoza agar sa žučnim solima TCBS Kobayashi agar (TCBS) (Biolife, pH 8,6 ± 0,2); ** Kromogeni agar CHROMagar™Vibrio (CHROMagar™, pH 9,0 ± 0,2); ***Slani hranjivi agar (Biolife, 1% NaCl, pH 7,2 ± 0,2,); **** Biokemijska identifikacija API sustavom (API NE) (Biomerieux)

Shema 2. Postupak dokazivanja prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

Tipične kolonije *V. parahaemolyticus* porasle na TCBS agaru su glatke, prozirne do zelene boje, s plavo zelenim centrom, promjera 2 - 3 mm, te neznatnom promjenom boje agara ispod poraslih kolonija. *V. vulnificus* raste također u obliku zelenih kolonija, a *V. alginolyticus* formira velike žute kolonije. *V. cholerae* na TCBS agaru raste u obliku glatkih, žutih do smeđkastih kolonija promjera 1 - 2 mm te s pojavom žute boje u agaru. Na CHROMagar™Vibrio *V. cholerae* i *V. vulnificus* formiraju glatke zeleno plave do tirkizno plave kolonije promjera 1 - 2 mm, dok *V. parahaemolyticus* raste u obliku glatkih svijetlo ljubičastih kolonija, promjera 1 - 2 mm. *V. alginolyticus* na ovom kromogenom agaru raste u obliku velikih mliječno bijelih kolonija.

Biokemijska identifikacija API 20 NE sustavom temelji se na sposobnosti bakterijskih stanica da iskorištavaju određene supstrate pri čemu dolazi do promjene boje nakon propisanog vremena inkubacije inokuliranih trakica/stripova. Reakcije se očitavaju prema uputi proizvođača, a identifikacija se obavlja pomoću softvera za identifikaciju.

4.3.2. Molekularna dijagnostika lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Za molekularnu dijagnostiku lančanom reakcijom polimerazom (PCR) praćene su upute referentne norme (HRN EN ISO 21872-1:2017). Metoda PCR uvedena je u postupke pretraživanja na uzorcima namnoženim u ASPV-u kroz opisana dva koraka. Za izolaciju DNA korišten je protokol kolonijalne izolacije. Od namnoženog uzorka u ASPV-u izuzet je površinski sloj u volumenu od 1 ml, te centrifugiran 6 minuta pri 13400 rpm (centrifuga HETTICH, MIKRO 120). Supernatant je dekantiran, a peleta isprana s 1 ml jednostruko koncentriranog tris EDTA pufera (TE pufer) (Lonza, AccuGENETM 1 x TE Buffer; 0,01M Tris, 0,001M EDTA, pH 7,4). Uzorak je potom izmiješan na vorteksu, te ponovo centrifugiran na 13400 rpm tijekom 6 minuta. Nakon odlijevanja supernatanta, u mikroepruvetu s peletom je dodano 500 µl TE pufera, sadržaj izmiješan na vorteksu do otapanja pelete te tako pripremljen uzorak toplinski obrađen u termo bloku pri 100 °C tijekom 10 minuta (THERMO-SHAKER, Kisker Biotech GmgH, TS-100). Po završetku zagrijavanja, uzorak je naglo hlađen u kadici s mrvljenim ledom tijekom 5 minuta te centrifugiran na 13400 rpm kroz 5 minuta. Odvojeni supernatan je izdvojen u čistu mikroepruvetu i pohranjen na -20 °C do izvođenja PCR-a.

Izolacija DNA iz suspektih kolonija te kontrolnih sojeva također je provedena kolonijalnom izolacijom. Iz čiste kulture na slanom hranjivom agaru izuzeta je jedna kolonija i razmućena u 500 µl TE pufera te toplinski obrađena u termo bloku pri 100 °C tijekom 10 minuta. Nastavak postupka je isti kao za bujonske kulture.

Svi postupci s uzorcima, uključujući suspektne kolonije i kontrolne sojeve do faze toplinske obrade, provedeni su u mikrobiološkom kabinetu s laminarnim strujanjem zraka.

Izolirana DNA čuvana je do provođenja PCR analize na temperaturi od -20 °C.

Za izvođenje PCR-a korištene su specifične početnice i kontrolni referentni sojevi *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; *V. vulnificus* ATCC 27562; okolišni izolati *V. parahaemolyticus tdh/trh+env.* i *V. cholerae env.* (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Teramo), pomoću kojih je dokazivana prisutnost genoma ciljanih vrsta, te prisutnost gena koji kodiraju *tdh* i *trh* kao čimbenike virulencije *V. parahaemolyticus*. Korištene su liofilizirane početnice proizvođača Metabion International AG, Njemačka, osim početnica za potvrdu *tdh* i *trh* gena *V. parahaemolyticus* koje su nabavljene od proizvođača MacroGen Humanizing Genomics, Seoul. Sve su početnice pripremljene prema uputi proizvođača, na način da se dobije 100 pmol/µl. Od početne otopine pripremljene su radne otopine početnica koncentracije 10 µM.

Tablica 4. Sekvence početnica za dokazivanje genoma *V. parahaemolyticus*

Bakterija	Početnice	Sekvence početnica
<i>V. parahaemolyticus</i>	VpTox (FW)	GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG
	VpTox (REV)	ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG

Tablica 5. Sekvence početnica za dokazivanje genoma za kodiranje toksina

V. parahaemolyticus tdh

Bakterija	Početnice	Sekvence početnica
<i>V. parahaemolyticus tdh</i>	L- <i>tdh</i>	GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC
	R- <i>tdh</i>	TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC

Tablica 6. Sekvence početnica za dokazivanje genoma za kodiranje toksina *V. parahaemolyticus trh*

Bakterija	Početnice	Sekvence početnica
<i>V. parahaemolyticus trh</i>	L- <i>trh</i>	TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT
	R- <i>trh</i>	CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G

Tablica 7. Sekvence početnica za dokazivanje genoma *V. cholerae*

Bakterija	Početnice	Sekvence početnica
<i>V. cholerae</i>	prVC (FW)	TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT
	prVC (REV)	AGT CAC TTA ACC ATA CAA CCC

Tablica 8. Sekvence početnica za dokazivanje genoma *V. vulnificus*

Bakterija	Početnice	Sekvence početnica
<i>V. vulnificus</i>	VVH (FW)	CCG GCG GTA CAG GTT GGC GC
	VVH (REV)	CGC CAC CCA CTT TCG GGC C

Lančana reakcija polimerazom izvođena je u konačnom volumenu od 20 µl, u uređaju PRIME THERMAL CYCLER, TECHNE. Za pripremu reakcijske mješavine korišten je premiks EmeraldAmp®MAX HS PCR Master Mix (Takara) dvostruke koncentracije, koji sadrži visoko učinkovitu, toplinom aktiviranu DNA polimerazu, optimizirane reakcijske pufere, dNTP-e i reagens za gustoću (*density reagent*). Također sadrži zelenu boju koja se elektroforezom razdvaja na žutu i zelenu, i služi kao indikator tijekom elektroforeze, odnosno migracije, pri čemu žuta boja migrira ispod 50 baznih parova (bp) (ako se koristi 1 % agarozni gel).

Korišteni su sljedeći udjeli za pripremu PCR mješavine: Master mix 10,0 µl; početnice (FW) 0,5 µl; početnice (REV) 0,5 µl; voda 7,0 µl; uzorak DNA 2,0 µl.

Uređaj za lančanu reakciju polimerazom programiran je za provođenje amplifikacijskih ciklusa prema postupku navedenom u normi HRN EN ISO 21872-1:2017.

Tablica 9. Amplifikacijski ciklusi za dokazivanje genoma *V. parahaemolyticus* (Tox-R) i genoma *V. vulnificus* (VVH)

Opis koraka	Temperatura i vrijeme	Broj ciklusa
Predgrijavanje	96 °C/5 min	1
Amplifikacija	denaturacija	94 °C/1 min
	prianjanje	63 °C/1,5 min
	produljivanje	72 °C/1,5 min
Postamplifikacija	72 °/7 min	1
Kraj	4 °C	

Tablica 10. Amplifikacijski ciklusi za dokazivanje genoma za kodiranje toksina *tdh/trh*

Opis koraka	Temperatura i vrijeme	Broj ciklusa
Predgrijavanje	94 °C/5 min	1
Amplifikacija	denaturacija	94 °C/1 min
	prianjanje	58 °C/1 min
	produljivanje	72 °C/1 min
Postamplifikacija	72 °/5 min	1
Kraj	4 °C	

Tablica 11. Amplifikacijski ciklusi za dokazivanje genoma *V. cholerae* - prVC

Opis koraka	Temperatura i vrijeme	Broj ciklusa
Predgrijavanje	94 °C/2 min	1
Amplifikacija	denaturacija	94 °C/1 min
	prianjanje	50 °C/1 min
	produljivanje	72 °C/1,5 min
Postamplifikacija	72 °/10 min	1
Kraj	4 °C	

Za elektroforezu u gelu korištena je 2 % agaroz (Lonza, SeaKem® LE Agarose) u tris-acetat EDTA puferu (TAE) (Lonza, AccuGENE® 50X TAE Buffer, 2M Tris-Acetate, 0,05 EDTA (disodium salt), pH 8,3). Radna otopina TAE pufera (10X) dobivena je razrjeđivanjem

s ultračistom vodom (uređaj Millipore, Direct - Q[®] 5 UV). Po zagrijavanju do potpunog otapanja, gel je hlađen u vodenoj kupelji na temperaturi 55 °C - 65 °C. Za detekciju nukleinskih kiselina u prohlađeni gel dodana je boja (Lonza, GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO) u jednostrukoj koncentraciji (5µl boje na 50 ml gela). Otopljeni gel je izliven u odgovarajuće kadice s postavljenim češljicima, te ostavljen na sobnoj temperaturi do potpunog stiskanja.

Za određivanje veličine DNA produkta (molekule) korišten je standardni DNA marker u volumenu od 2 µl (Takara, 100 bp DNA Ladder (Dye Plus)), koji sadrži 10 fragmenata od 100 do 1000 bp i dodatni fragment od 1500 bp.

Za svaki ciklus izvođenja PCR-a korištene su pozitivne (ATCC sojevi) i negativne kontrole (reakcijska mješavina bez uzorka).

Elektroforeza je provedena pri naponu od 130 V tijekom 65 do 80 minuta, ovisno o veličini gela u plastičnim kadicama THERMO SCIENTIFIC.

Za vizualizaciju produkta korišten je gel dokumentacijski sustav UVIDOC HD 5, UVITEC CAMBRIDGE, i pripadajući program za obradu podataka UVI TEC UVI 1-D.

Tablica 12. Očekivana veličina PCR produkta:

PCR metoda	Veličina produkta (bp)
<i>ToxR</i>	368
<i>tdh</i>	269
<i>trh</i>	500
<i>prVC</i>	295-310
<i>VVH</i>	519

4.3.3. Obrada podataka o vremenskim uvjetima i temperaturi mora

Podatci o vremenskim uvjetima i temperaturi mora u vrijeme uzorkovanja dobiveni su od Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ). Korišteni podatci prikupljeni su prizemnim meteorološkim motrenjem na glavnoj meteorološkoj postaji Pula. Površinska temperatura mora mjerena je na stalnoj točki mjerenja, na dubini od 30 cm te potom kontrolirana prije unošenja u informacijski sustav. Korišteni su podatci srednje dnevne temperature mora, koji su po danu uzorkovanja pridruženi rezultatima mikrobioloških pretraživanja. Ostali podatci o vremenskim uvjetima odnose se na srednje dnevne temperature zraka i oborine.

4.3.4. Statistička obrada podataka

Za obradu brojčanih podataka prikupljenih u istraživanju koristili smo računalni program Stata 13.1 (Stata Corp. USA).

Univarijantnu analizu povezanosti rezultata laboratorijskih pretraga s vrstom školjkaša, mjestom i godinom uzimanja uzorka provjerili smo korištenjem hi-kvadrat testa i Fisher-ovim egzaktnim testom. Okolišne uvjete (temperaturu mora i zraka) usporedili smo t-testom između lokacija s kojih je uzročnik utvrđen s vrijednostima na kojima ciljani mikroorganizam nije dokazan. Rezultate statističke obrade prikazali smo kao vjerojatnost (P vrijednost), a statistički značajnima smo smatrali vrijednosti manje od 0,05.

U model logističke regresije uvrstili smo varijable koje su s rezultatima laboratorijskih pretraga bile statistički značajno povezane u univarijantnoj analizi. Temperaturu mora i lokaciju pritom smo pretvorili u binarne varijable kako bismo usporedili utjecaj temperature mora više od 15 °C u odnosu na temperaturu ≤ 15 °C na rezultate laboratorijskih pretraga te usporedili pojavnost *V. parahaemolyticus* na zapadnoj obali Istre u odnosu na istočnu obalu. Rezultate logističke regresije prikazali smo kao izglede za izdvajanje uzročnika (OR - *odds ratio*) s pripadajućim P vrijednostima.

Rezultate izdvajanja *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* pri različitim temperaturama usporedili smo Kappa testom, a rezultate smo prikazali kao Kappa koeficijent s pripadajućim P vrijednostima.

5. REZULTATI

U tablicama 13. do 45., te u grafikonima 1. i 2. prikazan je broj prikupljenih i analiziranih uzoraka školjkaša prema vrstama i analizama tijekom 2017., 2018., 2019. i 2020. godine.

5.1. Rezultati mikrobiološke pretrage

U tablicama 13. do 17. prikazani su rezultati mikrobiološke pretrage školjkaša te rezultati povezani s lokacijom uzorkovanja, u odnosu na godinu uzorkovanja i temperaturu mora. Rezultati se odnose na mikrobiološku pretragu metodom HRN EN ISO 21872-1:20017 koja je u ukupno 15 uzoraka rezultirala dokazom prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

Tablica 13. Skupni rezultati mikrobiološke pretrage na prisutnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp. prema vrsti školjkaša (n= 632)

Uzorak**	Ukupno	Mikrobiološka pretraga*	
		Negativno	Pozitivno*** n (%)
Dagnje	335	326	9 (2,69)
Kamenice	58	56	2 (3,45)
Kapice	85	85	0
Kunjke	89	85	4 (4,49)
Prnjavice	40	40	0
Rumenke	25	25	0
Ukupno	632	617	15 (2,37)

*HRN EN ISO 21872-1:20017

**Živi školjkaši

*** Pozitivno na prisutnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

U tablici 13. prikazani su rezultati mikrobiološke pretrage školjkaša na prisutnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp. prema vrsti uzoraka. U devet uzoraka dagnji, dva uzorka kamenica i četiri uzorka kunjki mikrobiološkom pretragom dokazana je prisutnost *Vibrio* spp.

Opažene razlike u učestalosti nalaza pripadnika roda *Vibrio* između vrsta školjkaša nisu statistički značajne ($P = 0,369$).

Tablica 14. Rezultati mikrobiološke pretrage školjkaša na prisutnost *Vibrio* spp. prema lokaciji porijekla uzorka

Lokacija uzorkovanja	Ukupno	Mikrobiološka pretraga*	
		Negativno	Pozitivno** n (%)
L1 - I	34	33	1 (2,94)
L2 - I	28	27	1 (3,57)
L3 - Z	38	36	2 (5,26)
L4 - Z	38	37	1 (2,63)
L5 - Z	38	38	0
L6 - I	34	34	0
L7 - I	34	32	2 (5,88)
L8 - Z	38	37	1 (2,63)
L9 - I	34	33	1 (2,94)
L10 - Z	36	36	0
L11 - Z	38	36	2 (5,63)
L12 - Z	37	34	3 (8,11)
L13 - Z	32	31	1 (3,13)
L14 - Z	33	33	0
L15 - Z	37	37	0
L16 - Z	35	35	0
L17 - Z	33	33	0
L18 - Z	35	35	0
Ukupno	632	617	15 (2,37)

*HRN EN ISO 21872-1:20017

** Pozitivno na prisutnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

U tablici 14. prikazani su rezultati mikrobiološke pretrage školjkaša i nalaz *Vibrio* spp. na lokacijama uzorkovanja (18). Pripadnici roda *Vibrio* izdvojeni su iz uzoraka s ukupno

deset lokacija. Na lokacijama na kojima su izdvojeni pripadnici *Vibrio* spp., broj pozitivnih uzoraka kretao se od jedan do tri. Opažene razlike u učestalosti nalaza pripadnika *Vibrio* spp. klasičnom mikrobiološkom pretragom nisu statistički značajne ($P = 0,431$).

Tablica 15. Rezultati mikrobiološke pretrage školjkaša na prisutnost *Vibrio* spp. u odnosu na godinu uzorkovanja

Godina	Ukupno	Mikrobiološka pretraga*	
		Negativno	Pozitivno** n (%)
2017.	181	178	3 (1,66)
2018.	184	181	3 (1,63)
2019.	213	204	9 (4,23)
2020.	54	54	0
Ukupno	632	617	15 (2,37)

*HRN EN ISO 21872-1:20017

** Pozitivno na prisutnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

U tablici 15. prikazani su rezultati učestalosti nalaza *Vibrio* spp. prema godinama uzorkovanja. Pripadnici roda *Vibrio* izdvojeni su najčešće iz uzoraka uzorkovanih 2019. godine (devet uzoraka ili 4.23 %) dok u 2020. godini mikrobiološkom metodom nisu izdvojeni. Opažene razlike u učestalosti izdvajanja pripadnika roda *Vibrio* između različitih godina promatranja nisu statistički značajne ($P = 0,221$).

Tablica 16. Zbirni rezultati mikrobiološke pretrage školjkaša prema vrstama prisutnih potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

Uzorak*	Datum uzorkovanja	Lokacija uzorkovanja	Temperatura mora, °C	Temperatura zraka, °C	Mikrobiološka pretraga**
Dagnje	10.7.2017.	L3 - Z	27,3	28,5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Dagnje	7.8.2017.	L11 - Z	27,3	26,1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Kunjke	9.10.2017.	L13 - Z	20,3	15,3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Dagnje	4.6.2018.	L11 - Z	25,7	24	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Kunjke	13.8.2018.	L12 - Z	26,9	24,5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Dagnje	1.10.2018.	L8 - Z	21,5	14,6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Kunjke	14.1.2019.	L12 - Z	11,2	7,2	<i>Vibrio cholerae</i>
Dagnje	10.6.2019.	L3 - Z	22,5	25,5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Dagnje	15.7.2019.	L7 - I	24,7	23,1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Kamenice	15.7.2019.	L1 - I	24,7	23,1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Kunjke	19.8.2019.	L12 - Z	27,3	25,2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Dagnje	19.8.2019.	L9 - I	27,3	25,2	<i>Vibrio vulnificus</i>
Kamenice	16.9.2019.	L2 - I	23,6	21	<i>Vibrio vulnificus</i>
Dagnje	16.9.2019.	L7 - I	23,6	21	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Dagnje	11.11.2019.	L4 - Z	17,6	13,5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

*Živi školjkaši

**HRN EN ISO 21872-1:20017

U tablici 16. prikazani su svi uzorci u kojima je primjenom mikrobiološke metode dokazana prisutnost potencijalno patogenih bakterija roda *Vibrio*. Od ukupno 15 izolata, jedan izolat je *V. cholerae* izdvojen iz kunjki, dva su izolata *V. vulnificus* (jedan izdvojen iz dagnji i jedan iz kamenica), te 12 izolata *V. parahaemolyticus* (jedan iz kamenica, tri iz kunjki, te osam iz dagnji).

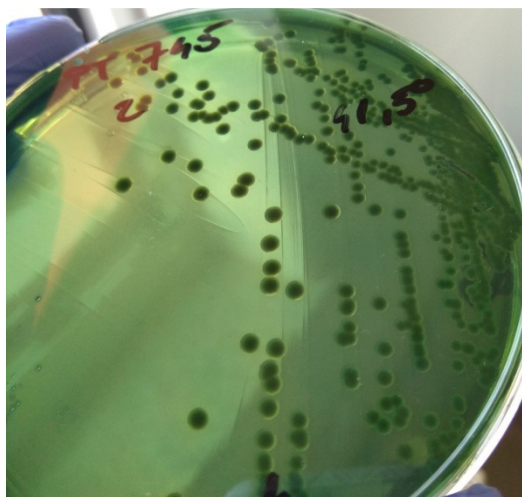
Tablica 17. Povezanost srednje vrijednosti temperatura mora i zraka (°C) u trenutku uzorkovanja školjkaša s postignutim rezultatima mikrobiološke pretrage

Temperatura, °C	Mikrobiološki nalaz	n	Srednja vrijednost, °C	Standardna devijacija, °C	P
Mora	Negativan	617	18,19	5,8	0,0005
	Potencijalno patogeni <i>Vibrio</i> spp.	15	23,43	4,45	
Zraka	Negativan	617	15,46	7,19	0,0031
	Potencijalno patogeni <i>Vibrio</i> spp.	15	21,18	5,90	

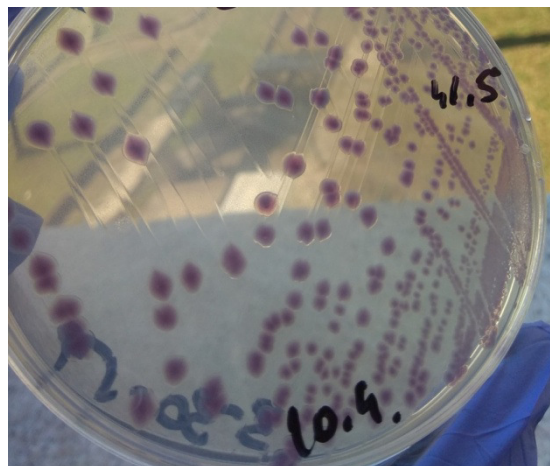
U tablici 17. prikazane su srednje vrijednosti temperature mora pri uzimanju uzoraka za mikrobiološku pretragu povezane s postignutim rezultatima pretraga, koji se statistički razlikuju između pozitivnih i negativnih uzoraka ($P = 0,0005$). Statistički značajna razlika između ovih dviju skupina rezultata opažena je i promatranjem srednje vrijednosti temperature zraka ($P = 0,0031$).

Svi uzorci koji su pokazali tipičan rast na selektivnim hranjivim podlogama, supkultivirani su na neselektivnu hranjivu podlogu te podvrgnuti biokemijskoj identifikaciji. Biokemijski pozitivni izolati dodatno su provjereni molekularnom PCR tehnikom.

Na slikama 19. do 23. prikazan je rast kolonija *Vibrio* spp. na selektivnim hranjivim podlogama.

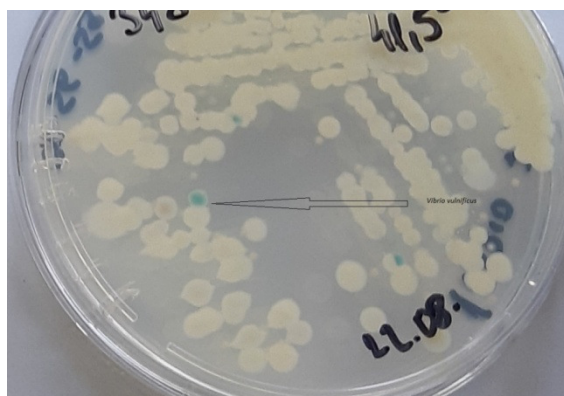


Slika 19. Kolonije *V. parahaemolyticus* na TCBS agaru (foto N. Džafić)

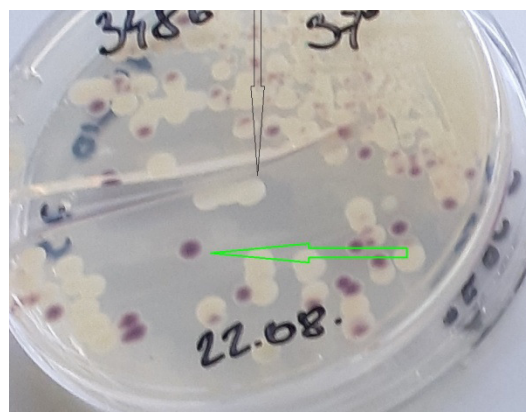


Slika 20. Kolonije *V. parahaemolyticus* na CHROMagar™ Vibrio (foto N. Džafić)

Na slikama 19. i 20. prikazane su kolonije *V. parahaemolyticus* izvojene u čistoj kulturi na TCBS agaru i CHROMagar™ Vibrio.

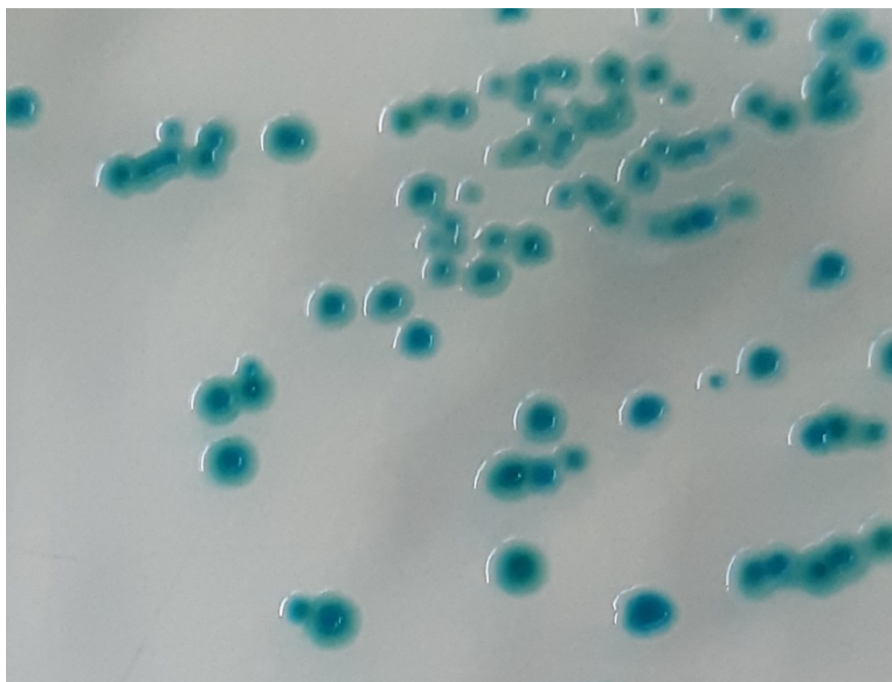


Slika 21. Kolonija *V. vulnificus* na CHROMagar™ Vibrio (foto N. Džafić)



Slika 22. Kolonije *V. parahaemolyticus* i *V. alginolyticus* na CHROMagar™ Vibrio (foto N. Džafić)

Slike 21. i 22. prikazuju kolonije *Vibrio* spp. na CHROMagar™ Vibrio. Uz obilan rast bijelih kolonija uočava se na slici 21. plava kolonija označena crnom strelicom, potvrđena kao *V. vulnificus*, te na slici 22. ljubičaste kolonije potvrđene kao *V. parahaemolyticus* (zelena strelica) i bijele kolonije *V. alginolyticus* (crna strelica).



Slika 23. *V. cholerae* na CHROMagar™Vibrio (foto N. Džafić)

Slika 23. prikazuje kulturu *V. cholerae* na CHROMagar™Vibrio, plavo zelene boje, s uvučenim središtem kolonije.

5.2. Rezultati molekularne dijagnostike lančanom reakcijom polimerazom (PCR) na prednamnoženim uzorcima

U tablicama 18. do 45. prikazani su rezultati PCR metoda na prednamnoženim uzorcima školjkaša. Rezultati su obrađeni i prikazani po vrstama potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

5.2.1. *V. cholerae*

Dokazivanje bakterijske vrste *V. cholerae* provedeno je nakon prednamnažanja uzoraka na temperaturi od 41,5 °C. Od ukupno 632 pretražena uzorka, njih šest (0,95 %) je bilo pozitivno na prisutnost bakterije *V. cholerae*.

U tablicama 18. do 21. prikazani su rezultati učestalosti dokaza PCR metodom vrste *V. cholerae* u pojedinim vrstama školjkaša u odnosu na lokaciju i godinu uzorkovanja te srednje vrijednosti temperatura mora i zraka.

Tablica 18. Rezultati dokazivanja *V. cholerae* u prednamnoženim uzorcima PCR metodom prema vrsti školjkaša

Uzorak*	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. cholerae</i>	
		Negativno	Pozitivno n (%)
Dagnje	335	330	5 (1,49)
Kamenice	58	58	0
Kapice	85	85	0
Kunjke	89	88	1 (1,12)
Prnjavice	40	40	0
Rumenke	25	25	0
Ukupno	632	626	6 (0,95)

*Živi školjkaši

U tablici 18. prikazana je učestalost bakterijske vrste *V. cholerae* dokazane PCR metodom. Bakterija je dokazana u ukupno šest uzoraka i to u dagnji (pet uzoraka) i kunjki (jedan uzorak). Opažene razlike u učestalosti dokazivanja *V. cholerae* između različitih vrsta živih školjkaša nisu statistički značajne ($P = 0,955$).

Tablica 19. Rezultati PCR pretrage za dokazivanja *V. cholerae* prema lokaciji porijekla uzorka

Lokacija	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. cholerae</i>	
		Negativno	Pozitivno n (%)
L1 - I	34	34	0
L2 - I	28	28	0
L3 - Z	38	38	0
L4 - Z	38	37	1 (2,63)
L5 - Z	38	37	1 (2,63)
L6 - I	34	33	1 (2,94)
L7 - I	34	33	1 (2,94)
L8 - Z	38	38	0
L9 - I	34	34	0
L10 - Z	36	35	1 (2,78)
L11 - Z	38	38	0
L12 - Z	37	36	1 (2,7)
L13 - Z	32	32	0
L14 - Z	33	33	0
L15 -Z	37	37	0
L16 - Z	35	35	0
L17 - Z	33	33	0
L18 - Z	35	35	0
UKUPNO	632	626	6 (0,95)

Tablica 19. prikazuje rezultate pretrage na *V. cholerae* PCR metodom koja je u uzorcima školjkaša dokazana na šest lokacija. Opažene razlike u učestalosti dokazivanja *V. cholerae* između lokacija nisu statistički značajne ($P = 0,945$).

Tablica 20. Učestalost dokaza *V. cholerae* PCR metodom po godinama istraživanja

Godina	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. cholerae</i>	
		Negativno	Pozitivno n (%)
2017.	181	180	1 (0,55)
2018.	184	184	0
2019.	213	208	5 (2,35)
2020.	54	54	0
Ukupno	632	626	6 (0,95)

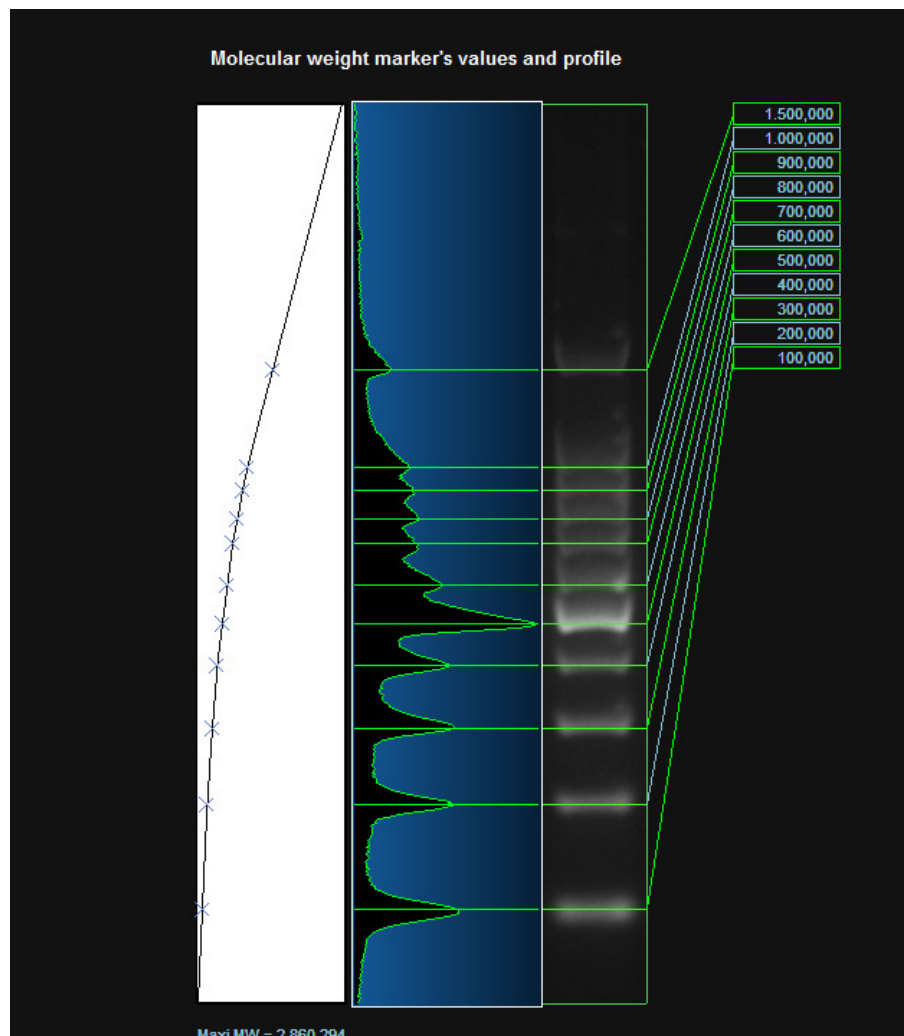
U tablici 20. prikazana je učestalost dokaza *V. cholerae* po godinama istraživanja. Bakterija je dokazana u uzorcima prikupljenim tijekom 2019. (pet uzoraka) i 2017. (jedan uzorak). Opažene razlike u učestalosti dokazivanja bakterijske vrste *V. cholerae* između godina nisu statistički značajne ($P = 0,103$).

Tablica 21. Povezanost srednje vrijednosti temperatura mora i zraka ($^{\circ}\text{C}$) u trenutku uzorkovanja školjaka s postignutim rezultatima pretraživanja PCR metodom za *V. cholerae*

Temperatura, $^{\circ}\text{C}$	PCR pretraga	n	Srednja vrijednost, $^{\circ}\text{C}$	Standardna devijacija, $^{\circ}\text{C}$	P
Mora	Negativan	626	18,28	5,82	0,2359
	Pozitivan	6	21,65	5,31	
Zraka	Negativan	626	15,54	7,18	0,0155
	Pozitivan	6	22,26	7,40	

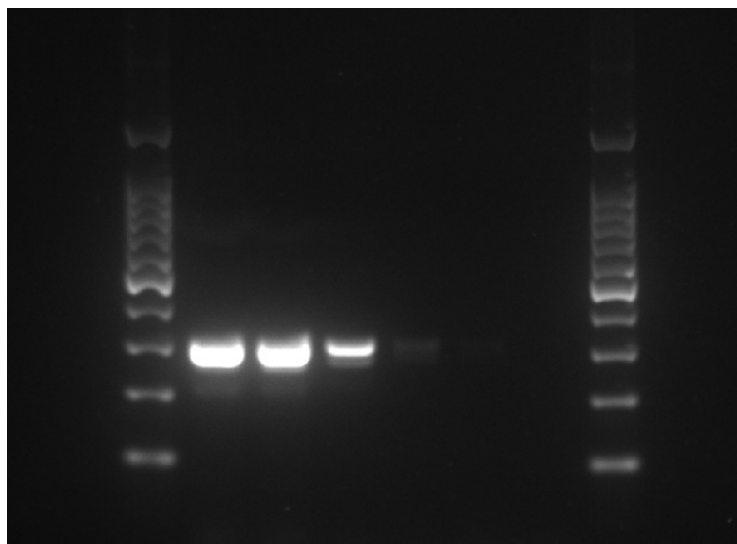
Tablica 21. prikazuje kako nema statistički značajne razlike između temperatura mora na lokacijama s uzorcima pozitivnima na prisutnost *V. cholerae* i onima gdje prisutnost ove vrste nije dokazana ($P = 0,2359$). Nasuprot tome, temperatura zraka statistički se razlikovala ($P = 0,0155$).

Slika 24. prikazuje profil DNA markera korištenog u elektroforezi PCR produkata uzoraka.

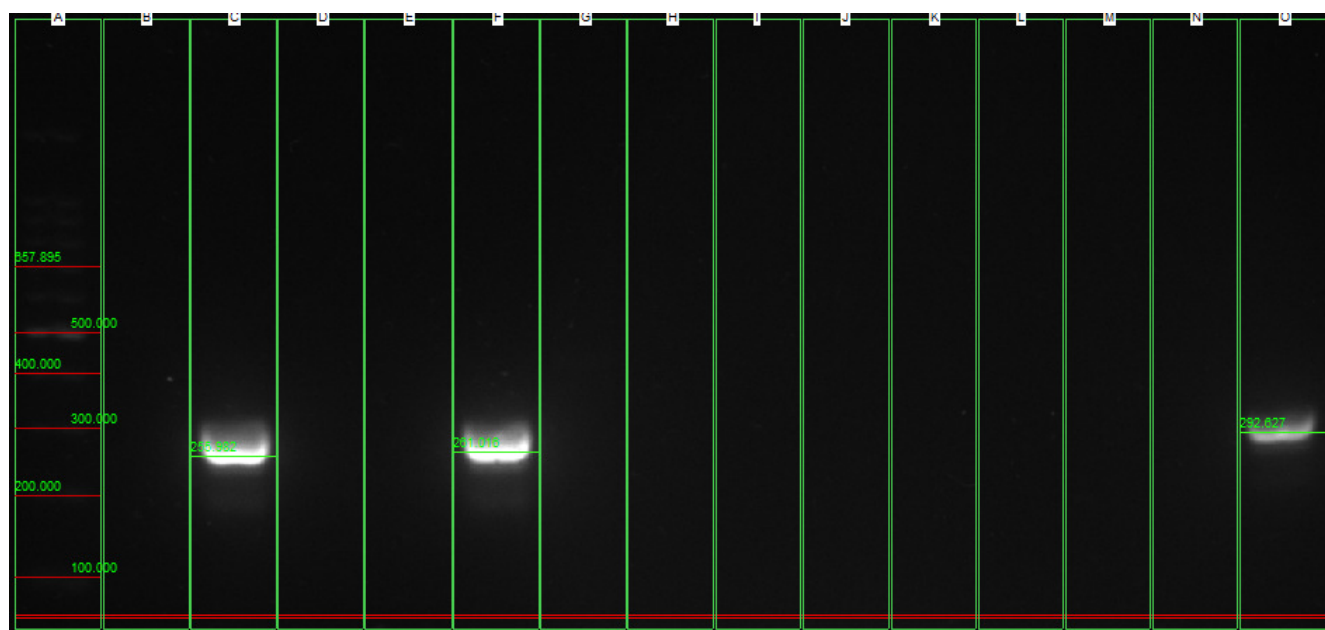


Slika 24. DNA marker (Takara, 100 bp DNA Ladder (Dye Plus) – profil i molekularne težine (foto N. Džafić)

Slike 25. i 26. dio su fotodokumentacije i prikazuju vizualizirani PCR produkt nakon gel elektroforeze. Slika 25. prikazuje pripremu pozitivne kontrole bakterije *V. cholerae* kroz decimalna razrjeđenja, koja je korištena u PCR protokolu. Slika 26. prikazuje dva uzorka pozitivna na bakteriju *V. cholerae*, u stupcima C i F, dok je pozitivna kontrola u posljednjem stupcu.



Slika 25. Priprema pozitivne kontrole bakterije *V. cholerae*: DNA marker (prvi i zadnji stupac) i decimalna razrjeđenja pozitivne kontrole *V. cholerae*, veličina produkta *prVC* gena 295-310 bp (foto N. Džafić)



Slika 26. Serija uzoraka: DNA marker (prvi stupac), uzorci pozitivni na *prVC* gen bakterije *V. cholerae* (stupac C i F) i pozitivna kontrola (stupac O) (foto N. Džafić)

5.2.2. *V. parahaemolyticus* (41,5 °C)

Prisutnost bakterijske vrste *V. parahaemolyticus* praćena je tijekom cijelog perioda istraživanja, s tim da su prve dvije godine uzorci pretraživani samo na temperaturi prednamnažanja od 41,5 °C.

Rezultati PCR pretrage prikazani su u tablicama 22. do 26.

Tablica 22. Rezultati nalaza *V. parahaemolyticus* PCR metodom u uzorcima prednamnoženim na 41,5 °C prema vrsti školjkaša

Uzorak*	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. parahaemolyticus</i> **	
		Negativno	Pozitivno n (%)
Dagnje	335	264	71 (21,19)
Kamenice	58	52	6 (10,34)
Kapice	85	80	5 (5,88)
Kunjke	89	70	19 (21,35)
Prnjavice	40	34	6 (15)
Rumenke	25	20	5 (20)
Ukupno	632	520	112 (17,72)

*Živi školjkaši

**Temperatura prednamnažanja 41,5 °C

U tablici 22. prikazana je učestalost dokazivanja *V. parahaemolyticus* prema vrstama školjkaša, uz temperaturu prednamnažanja od 41,5 °C. Ova bakterija je dokazana u ukupno 112 uzoraka. Bakterija je češće dokazana u kunjkama (21,35 %) i dagnjama (21,19 %), a rjeđe u kamenicama (10,34 %) i kapicama (5,88 %). Opažene razlike u učestalosti dokazivanja vrste *V. parahaemolyticus* između različitih vrsta živih školjkaša statistički su značajne ($P = 0,014$).

Tablica 23. Rezultati PCR pretrage na *V. parahaemolyticus* u uzorcima prednamnoženim na 41,5 °C prema lokaciji porijekla školjkaša

Lokacija	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. parahaemolyticus</i> *	
		Negativno	Pozitivno n (%)
L1 - I	34	29	5 (14,71)
L2 - I	28	28	0
L3 - Z	38	25	13 (34,21)
L4 - Z	38	28	10 (26,32)
L5 - Z	38	26	12 (31,58)
L6 - I	34	31	3 (8,82)
L7 - I	34	25	9 (26,47)
L8 - Z	38	35	3 (7,89)
L9 - I	34	29	5 (14,71)
L10 - Z	36	30	6 (16,67)
L11 - Z	38	29	9 (23,68)
L12 - Z	37	24	13 (35,14)
L13 - Z	32	28	4 (12,5)
L14 - Z	33	28	5 (15,15)
L15 - Z	37	28	9 (24,32)
L16 - Z	35	35	0
L17 - Z	33	29	4 (12,12)
L18 - Z	35	33	2 (5,71)
UKUPNO	632	520	112 (17,72)

*Temperatura prednamnažanja 41,5 °C

Tablica 23. prikazuje učestalost dokazivanja *V. parahaemolyticus* od 17,27 %, dok je najviša učestalost na lokaciji L12 – Z (35,14 %). U uzorcima s dvaju lokaliteta, L2 - I i L16 - Z ova vrsta nije dokazana niti jednom. Opažene razlike u učestalosti dokazivanja *V. parahaemolyticus* između različitih lokaliteta uzorkovanja, statistički su značajne ($P < 0,0001$).

Tablica 24. Učestalost nalaza *V. parahaemolyticus* u uzorcima školjkaša prednamnoženim na 41,5 °C PCR pretragom po godinama istraživanja

Uzorak	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. parahaemolyticus</i> *	
		Negativno	Pozitivno n (%)
2017.	181	142	39 (21,55)
2018.	184	144	40 (21,74)
2019.	213	182	31 (14,55)
2020.	54	52	2 (3,7)
Ukupno	632	520	112 (17,72)

*Temperatura prednamnažanja 41,5 °C

U tablici 24. prikazana je učestalost dokaza *V. parahaemolyticus* PCR metodom u uzorcima prikupljenima tijekom svih godina istraživanja. Najčešće je bakterija dokazana u uzorcima prikupljenima 2017. i 2018. godine, dok je u uzorcima prikupljenima 2020. godine bila potvrđena u samo 3,7 % pretraženih uzoraka. Opažene razlike u učestalosti dokazivanja vrste *V. parahaemolyticus* između godina statistički su značajne ($P = 0,006$).

Tablica 25. Povezanost srednje vrijednosti temperatura mora i zraka (°C) s rezultatima pretraživanja uzoraka školjkaša prednamnoženih na 41,5 °C PCR metodom za dokaz *V. parahaemolyticus*

Temperatura, °C	PCR pretraga	n	Srednja vrijednost, °C	Standardna devijacija, °C	P
Mora	Negativan	520	17,51	5,67	< 0,0001
	Pozitivan	112	22,04	5,02	
Zraka	Negativan	520	14,81	7,02	< 0,0001
	Pozitivan	112	19,28	6,95	

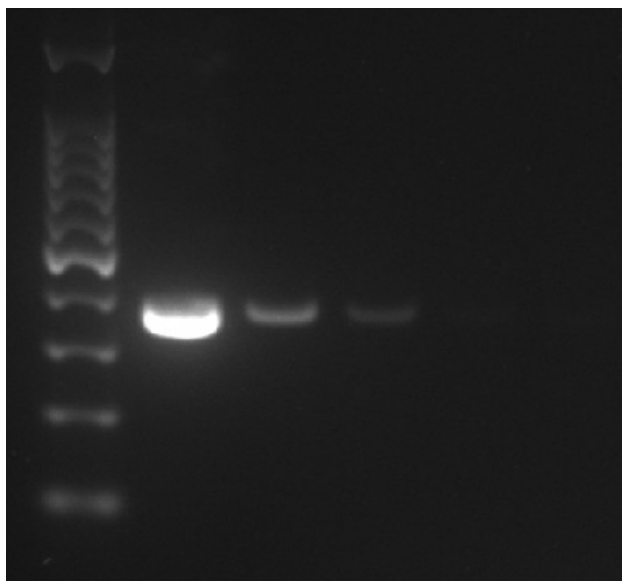
U tablici 25. prikazane su srednje vrijednosti temperature mora na lokacijama uzorkovanja školjkaša u kojima je dokazana vrsta *V. parahaemolyticus*, koje su se statistički razlikovale od temperature mora lokacija uzoraka u kojima nije dokazana ova vrsta ($P < 0,0001$). Isto tako, temperatura zraka statistički se značajno razlikovala ($P < 0,0001$).

Tablica 26. Omjer izgleda (OR- *odds ratio*) za dokazivanje *V. parahaemolyticus* pri inkubaciji na 41,5 °C

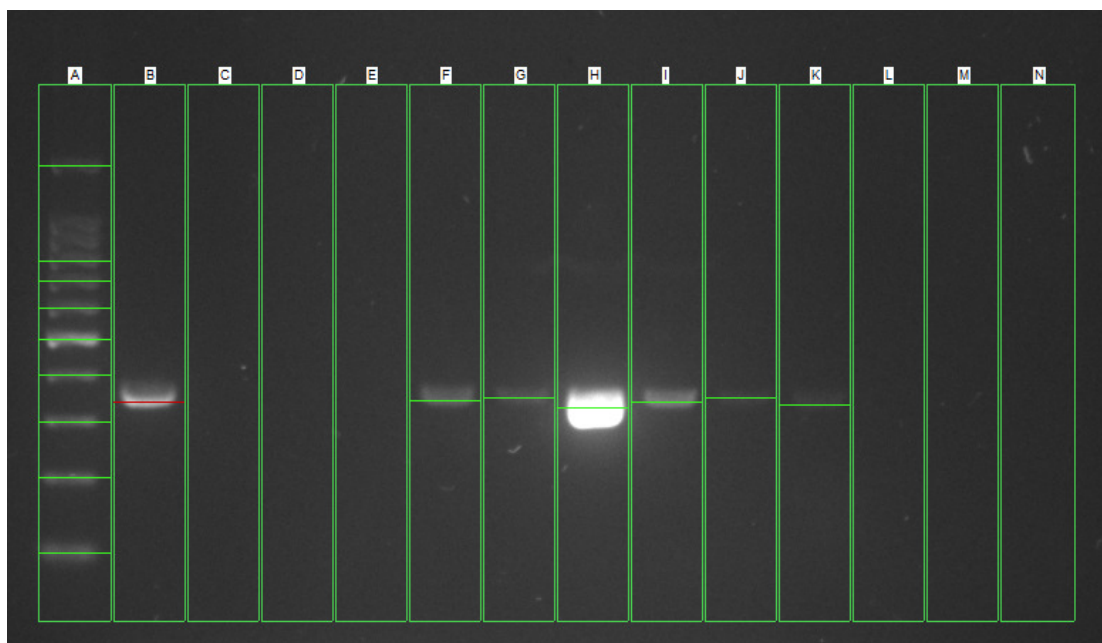
Čimbenik	OR	SE	T	P	95 %-tni interval povjerenja
Godina	0,87	0,11	-1,08	0,281	0,67 – 1,12
Temperatura (> 15 : ≤ 15 °C)	5,18	1,65	5,16	0,000	2,77 – 9,69
Lokacija (istočna:zapadna obala)	1,042	0,25	0,17	0,868	0,64 – 1,69

Tablica 26. prikazuje omjer izgleda za dokazivanje *V. parahaemolyticus* koji je 5,18 puta veći ako je temperatura mora iznad 15 °C ($P < 0,001$). Omjer izgleda nije statistički povezan s godinom promatranja niti sa smještajem lokacije uzorkovanja na istočnoj ili zapadnoj obali.

Slike 27. i 28. prikazuju vizualizirane PCR produkte nakon gel elektroforeze. Na slici 27. prikazana su decimalna razrjeđenja pozitivne kontrole bakterije *V. parahaemolyticus*, dok je na slici 28. prikazana serija uzorka za koje je utvrđeno da su pozitivni na prisutnost *ToxR* gena bakterije *V. parahaemolyticus*.



Slika 27. Priprema pozitivne kontrole bakterije *V. parahaemolyticus*: DNA marker u prvom stupcu; drugi, treći i četvrti stupac decimalna razrjeđenja pozitivne kontrole *V. parahaemolyticus*, veličina produkta *ToxR* gena 368 bp (foto N. Džafić)



Slika 28. Serija uzoraka: stupac A - DNA marker, stupac B - pozitivna kontrola, stupci F do K - uzorci pozitivni na prisutnost *ToxR* gena bakterije *V. parahaemolyticus* (foto N. Džafić)

5.2.3. *V. vulnificus* (41,5 °C)

Prisutnost bakterijske vrste *V. vulnificus* praćena je tijekom cijelog razdoblja istraživanja, s tim da su prve dvije godine uzorci pretraživani samo na temperaturi prednamnažanja od 41,5 °C.

Rezultati su prikazani u tablicama 27. do 30.

Tablica 27. Rezultati pretraživanja PCR metodom za dokaz *V. vulnificus* u uzorcima prednamnoženim na 41,5 °C prema vrsti školjkaša

Uzorak*	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. vulnificus</i> **	
		Negativno	Pozitivno n (%)
Dagnje	335	317	18 (5,37)
Kamenice	58	56	2 (3,45)
Kapice	85	85	0
Kunjke	89	86	3 (3,37)
Prnjavice	40	39	1 (2,5)
Rumenke	25	24	1 (4,0)
Ukupno	632	607	25 (3,96)

*Živi školjkaši

**Temperatura prednamnažanja 41,5 °C

Tablica 27. Prikazuje rezultate učestalosti dokazivanja *V. vulnificus* prema vrsti školjkaša, uz temperaturu prednamnažanja od 41,5 °C. Ova bakterijska vrsta dokazana je u ukupno 25 (3,96 %) uzoraka. Opažene razlike u učestalosti izdvajanja *V. vulnificus* između različitih vrsta živih školjkaša nisu statistički značajne ($P = 0,259$).

Tablica 28. Rezultati PCR pretrage za dokaz *V. vulnificus* u uzorcima prednamnoženim na 41,5 °C prema lokaciji porijekla školjkaša

Lokacija	Ukupno	PCR pretraga – <i>V. vulnificus</i> *	
		Negativno	Pozitivno n (%)
L1 - I	34	34	0
L2 - I	28	26	2 (7,14)
L3 - Z	38	33	5 (13,16)
L4 - Z	38	36	2 (5,26)
L5 - Z	38	34	4 (10,53)
L6 - I	34	34	0
L7 - I	34	31	3 (8,82)
L8 - Z	38	38	0
L9 - I	34	33	1 (2,94)
L10 - Z	36	34	2 (5,56)
L11 - Z	38	37	1 (2,63)
L12 - Z	37	34	3 (8,11)
L13 - Z	32	32	0
L14 - Z	33	32	1 (3,03)
L15 -Z	37	36	1 (2,7)
L16 - Z	35	35	0
L17 - Z	33	33	0
L18 - Z	35	35	0
UKUPNO	632	607	25 (3,96)

*Temperatura prednamnažanja 41,5 °C

U tablici 28. prikazana je učestalost dokaza *V. vulnificus* od 3,96 %. Najčešće je ova vrsta dokazana na lokaciji L3 – Z (13,16 %), dok u uzorcima sa sedam lokaliteta nije dokazana. Opažene razlike u učestalosti dokazivanja *V. vulnificus* između različitih lokaliteta uzorkovanja, statistički su značajne ($P = 0,043$).

Tablica 29. Učestalost dokaza *V. vulnificus* u uzorcima školjkaša prednamnoženim na 41,5 °C PCR pretragom po godinama istraživanja

Uzorak	Ukupno	PCR pretraga – <i>V. vulnificus</i> *	
		Negativno	Pozitivno n (%)
2017.	181	179	2 (1,10)
2018.	184	171	13 (7,07)
2019.	213	203	10 (4,69)
2020.	54	54	0
Ukupno	632	607	25 (3,96)

*Temperatura prednamnažanja 41,5 °C

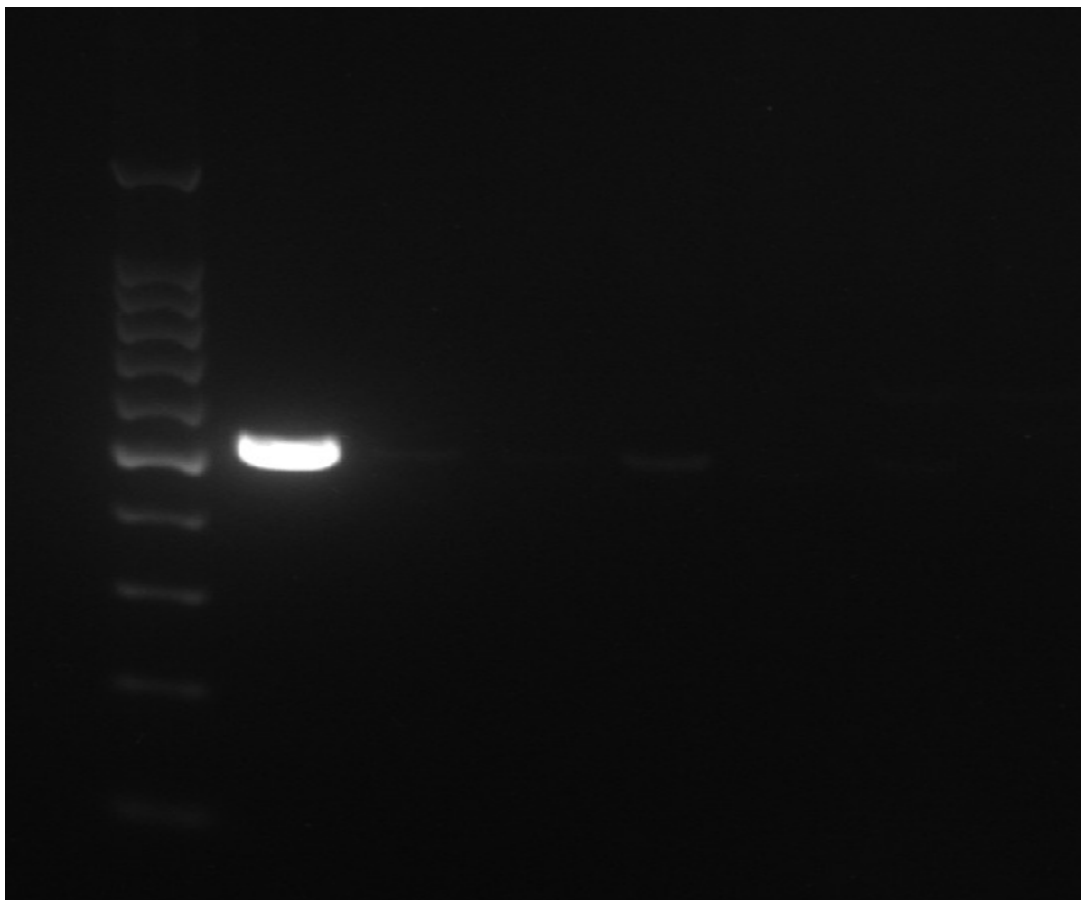
U tablici 29. prikazana je učestalost dokaza bakterijske vrste *V. vulnificus*, u uzorcima prikupljenim tijekom tri godine istraživanja. Najčešće je dokazana u uzorcima iz 2018. godine, dok u uzorcima prikupljenima 2020. godine nije dokazana. Opažene razlike u učestalosti dokazivanja *V. vulnificus* između godina statistički su značajne ($P = 0,009$).

Tablica 30. Povezanost srednje vrijednosti temperatura mora i zraka (°C) s rezultatima pretraživanja uzoraka prednamnoženih na 41,5 °C PCR metodom za dokaz *V. vulnificus*

Temperatura, °C	PCR pretraga	n	Srednja vrijednost, °C	Standardna devijacija, °C	P
Mora	Negativan	607	18,14	5,78	0,0004
	Pozitivan	25	22,56	5,15	
Zraka	Negativan	607	15,42	7,19	0,0027
	Pozitivan	25	19,92	6,46	

U tablici 30. prikazane su srednje vrijednosti temperature mora na lokacijama uzorkovanja školjkaša u kojima je dokazana vrsta *V. vulnificus* koja se statistički razlikovala od temperatura mora pri kojima su uzeti uzorci u kojih nije dokazana ova vrsta ($P = 0,0004$). Isto tako, temperatura zraka na lokacijama statistički se značajno razlikovala ($P = 0,0027$).

Na slici 29. prikazana je serija uzoraka, odnosno vizualizirani PCR produkti nakon gel elektroforeze.



Slika 29. Serija uzoraka: prvi stupac - DNA marker, drugi stupac - pozitivna kontrola, treći, četvrti i peti stupac - uzorci pozitivni na prisutnost gena bakterije *V. vulnificus*, veličina PCR produkta 520 bp (foto N. Džafić)

5.2.4. *V. parahaemolyticus* (37 °C)

Ukupno 267 uzoraka školjkaša je pretraženo na prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus* korištenjem dviju temperatura prednamnažanja. Rezultati ostvareni pri temperaturi prednamnažanja od 37 °C prikazani su u tablicama 31. do 34.

Tablica 31. Rezultati pretraživanja PCR metodom za dokaz *V. parahaemolyticus* u uzorcima prednamnoženim na 37 °C prema vrsti školjkaša

Uzorak*	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. parahaemolyticus</i> **	
		Negativno	Pozitivno n (%)
Dagnje	143	115	28 (19,58)
Kamenice	30	25	5 (16,67)
Kapice	36	36	0
Kunjke	37	31	6 (16,22)
Prnjavice	11	11	0
Rumenke	10	8	2 (20,00)
Ukupno	267	226	41 (15,36)

*Živi školjkaši

**Temperatura prednamnažanja 37 °C

U tablici 31. prikazana je povezanost vrste školjkaša s dokazom bakterije *V. parahaemolyticus* uz temperaturu prednamnažanja pri 37 °C. Navedena bakterija dokazana je ukupno u 41 uzorku (15,36 %). Najčešće je dokazana u rumenkama (20 %) i dagnjama (19,58 %), dok u prnjavicama i kapticama nije dokazana. Opažene razlike u učestalosti dokaza vrste *V. parahaemolyticus* između uzoraka različitih vrsta živih školjkaša inkubiranih pri temperaturi 37 °C statistički su značajne ($P = 0,02$).

Tablica 32. Rezultati pretraživanja PCR metodom za dokaz *V. parahaemolyticus* u uzorcima prednamnoženim na 37 °C prema lokaciji porijekla školjkaša

Lokacija	Ukupno	PCR pretraga – <i>V. parahaemolyticus</i> *	
		Negativno	Pozitivno n (%)
L1 - I	14	12	2 (14,29)
L2 - I	11	10	1 (9,09)
L3 - Z	17	14	3 (17,65)
L4 - Z	16	12	4 (25,00)
L5 - Z	16	13	3 (18,75)
L6 - I	15	12	3 (13,33)
L7 - I	15	9	6 (40,00)
L8 - Z	16	13	3 (18,75)
L9 - I	15	13	2 (20,00)
L10 - Z	15	14	1 (6,67)
L11 - Z	16	13	3 (18,75)
L12 - Z	16	12	4 (25,00)
L13 - Z	13	13	0
L14 - Z	14	14	0
L15 - Z	16	12	4 (25,00)
L16 - Z	14	14	0
L17 - Z	14	14	0
L18 - Z	14	12	2 (14,29)
UKUPNO	267	226	41 (15,36)

*Temperatura prednamnažanja 37 °C

U tablici 32. vidljiva je najviša učestalost dokaza *V. parahaemolyticus* na lokaciji L7 - I, dok u uzorcima s četiriju lokaliteta (L13 - Z, L14 - Z, L16 - Z i L17 - Z) ova vrsta nije dokazana. Opažene razlike u učestalosti dokazane prisutnosti bakterijske vrste *V. parahaemolyticus* između različitih lokaliteta uzorkovanja, nisu statistički značajne ($P = 0,148$).

Tablica 33. Učestalost dokaza *V. parahaemolyticus* u uzorcima školjkaša prednamnoženim na 37 °C PCR pretragom po godinama istraživanja

Uzorak	Ukupno	PCR pretraga – <i>V. parahaemolyticus</i> *	
		Negativno	Pozitivno n (%)
2019.	213	176	37 (17,37)
2020.	54	50	4 (7,41)
Ukupno	267	226	41 (15,36)

*Temperatura prednamnažanja 37 °C

U tablici 33. prikazani su rezultati dokazivanja prisutnosti vrste *V. parahaemolyticus* po godinama istraživanja. Dokazana je u 41 uzorku (15,36 %). Češće je dokazana u uzorcima prikupljenima 2019. godine. Opažene razlike u učestalosti dokazivanja *V. parahaemolyticus* između godina statistički su značajne ($P = 0,047$).

Tablica 34. Povezanost srednje vrijednosti temperatura mora i zraka (°C) s rezultatima pretraživanja uzoraka školjkaša prednamnoženih na 37 °C PCR metodom za dokaz *V. parahaemolyticus*

Temperatura, °C	PCR pretraga	N	Srednja vrijednost, °C	Standardna devijacija, °C	P
Mora	Negativan	226	16,07	5,38	0,0023
	Pozitivan	41	20,70	6,06	
Zraka	Negativan	226	13,46	6,24	0,0004
	Pozitivan	41	18,86	7,23	

U tablici 34. prikazane su srednje vrijednosti temperatura mora na lokacijama uzimanja uzoraka u kojima je dokazana bakterija *V. parahaemolyticus* pri inkubiranju na 37 °C, a koje su se statistički razlikovale od temperatura mora na kojima su uzeti uzorci u kojima ova vrsta nije dokazana ($P < 0,0023$). Isto tako, temperatura zraka statistički se značajno razlikovala ($P < 0,0004$).

5.2.5. *V. vulnificus* (37 °C)

Ukupno 267 uzoraka školjkaša je pretraženo na prisutnost bakterije *V. vulnificus* korištenjem dviju temperatura prednamnažanja. Rezultati ostvareni primjenom temperature prednamnažanja od 37 °C su prikazani u tablicama 35., 36., 37. i 38.

Tablica 35. Rezultati dokazivanja *V. vulnificus* PCR pretragom u uzorcima prednamnoženim na 37 °C prema vrsti školjkaša

Uzorak*	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. vulnificus</i> **	
		Negativno	Pozitivno n (%)
Dagnje	143	130	13 (9,09)
Kamenice	30	26	4 (13,33)
Kapice	36	35	1 (2,78)
Kunjke	37	35	2 (5,41)
Prnjavice	11	11	0
Rumenke	10	9	1 (10,00)
Ukupno	267	246	21 (7,87)

*Živi školjkaši

** Temperatura prednamnažanja 37 °C

U tablici 35. prikazana je učestalost dokaza bakterijske vrste *V. vulnificus* PCR metodom nakon prednamnažanja pri 37 °C u različitim vrstama školjkaša. Pretraživana bakterijska vrsta dokazana je u 21 uzorku. Opažene razlike u učestalosti izdvajanja *V. vulnificus* između različitih vrsta živih školjkaša nisu statistički značajne ($P = 0,571$).

Tablica 36. Rezultati pretraživanja PCR metodom za dokaz *V. vulnificus* u uzorcima prednamnoženima na 37 °C prema lokaciji porijekla školjkaša

Lokacija	Ukupno	PCR pretraga – <i>V. vulnificus</i> *	
		Negativno	Pozitivno n (%)
L1 - I	14	13	1 (7,14)
L2 - I	11	9	2 (18,18)
L3 - Z	17	14	3 (17,65)
L4 - Z	16	15	1 (6,25)
L5 - Z	16	14	2 (12,50)
L6 - I	15	15	0
L7 - I	15	14	1 (6,67)
L8 - Z	16	14	2 (12,50)
L9 - I	15	15	0
L10 - Z	15	13	2 (13,33)
L11 - Z	16	14	2 (12,50)
L12 - Z	16	14	2 (12,50)
L13 - Z	13	12	1 (7,69)
L14 - Z	14	14	0
L15 - Z	16	15	1 (6,25)
L16 - Z	14	14	0
L17 - Z	14	13	1 (7,14)
L18 - Z	14	14	0
UKUPNO	267	246	21 (7,87)

* Temperatura prednamnažanja 37 °C

U tablici 36. prikazana je povezanost dokaza vrste *V. vulnificus* s lokacijom porijekla uzorka. Najviša učestalost *V. vulnificus* zabilježena je na lokaciji L2 - I. U 18,18 % uzoraka živih školjkaša s ovog lokaliteta dokazan je *V. vulnificus*, dok u uzorcima s pet lokaliteta, nije dokazan niti jednom. Opažene razlike u učestalosti izdvajanja vrste *V. vulnificus* između različitih lokaliteta uzorkovanja nisu statistički značajne ($P = 0,759$).

Tablica 37. Učestalost dokaza *V. vulnificus* u uzorcima školjkaša prednamnoženima na 37 °C PCR pretragom po godinama istraživanja

Uzorak	Ukupno	PCR pretraga - <i>V. vulnificus</i> *	
		Negativno	Pozitivno n (%)
2019.	213	192	21 (9,86)
2020.	54	54	0
Ukupno	267	246	21 (7,87)

* Temperatura prednamnažanja 37 °C

U tablici 37. prikazani su rezultati dokaza *V. vulnificus* kroz dvije godine istraživanja. Ta bakterijska vrsta je dokazana PCR metodom nakon prednamnažanja pri 37 °C u uzorcima prikupljenim tijekom 2019. godine u 9,86 % uzoraka, dok u uzorcima prikupljenima 2020. godine nije dokazana. Opažene razlike u učestalosti izdvajanja *V. vulnificus* između godina promatranja statistički su značajne ($P = 0,007$).

Tablica 38. Povezanost srednje vrijednosti temperatura mora i zraka (°C) s rezultatima pretraživanja uzoraka školjkaša prednamnoženih na 37°C PCR metodom za dokaz *V. vulnificus*

Temperatura, °C	PCR pretraga	n	Srednja vrijednost, °C	Standardna devijacija, °C	P
Mora	Negativan	246	16,39	5,55	0,0026
	Pozitivan	21	21,37	5,94	
Zraka	Negativan	246	13,94	6,59	0,0022
	Pozitivan	21	18,37	6,42	

Tablica 38. prikazuje srednje vrijednosti temperature mora na lokacijama uzimanja uzoraka u kojima je dokazana bakterija *V. vulnificus* koja se statistički razlikovala od temperatura mora na kojima su uzeti uzorci u kojima nije dokazana ova vrsta ($P = 0,0026$). Isto tako, temperatura zraka statistički se značajno razlikovala ($P = 0,0022$).

5.2.6. Podudarnost rezultata dokaza prisutnosti vrsta *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* PCR metodom pri temperaturama prednamnažanja 41,5 °C i 37 °C

U tablici 39. prikazana je podudarnost rezultata dokazivanja bakterije *V. parahaemolyticus* pri temperaturama prednamnažanja od 37 °C i 41,5 °C. Uspoređeni su rezultati za godine 2019. i 2020., kad su uzorci prednamnažani na dvije temperature.

Tablica 39. Podudarnost ostvarenih rezultata dokaza *V. parahaemolyticus* PCR metodom pri temperaturi prednamnažanja od 37 °C i 41,5 °C

Ostvareni rezultat	PCR pretraga <i>V. parahaemolyticus</i>		Podudarni rezultati / broj uzoraka n	Nepodudarni rezultati / broj uzorka n
	Pozitivan / 37 °C, broj uzoraka n	Negativan / 37 °C, broj uzoraka n		
Pozitivan / 41,5 °C, broj uzoraka n	25*	8**	243*	24**
Negativan / 41,5 °C, broj uzoraka n	16**	218*		
Ukupno uzoraka n			267	

* isti rezultati ostvareni na obje temperature prednamnažanja

** različiti rezultati ostvareni na obje temperature prednamnažanja

Ukupan broj uzoraka školjkaša pretražen korištenjem PCR metode za dokaz bakterije *V. parahaemolyticus* u bujonima nakon prednamnažanja na obje temperature (41,5 °C i 37 °C) bio je 267.

Iz tablice 39. vidimo sukladnost odnosno podudarnost ostvarenih rezultata primjenom različitih temperatura prednamnažanja. Pozitivni nalazi bakterija na obje temperature prednamnažanja zabilježeni su u 25 uzoraka, a negativni u 218 uzoraka. Stoga se na tih 243 (25 + 218) uzorka rezultati savršeno podudaraju u smislu da su pozitivni odnosno negativni neovisno o korištenoj temperaturi prednamnažanja. U 16 uzoraka pozitivni rezultati su ostvareni primjenom temperature prednamnažanja od 37 °C, dok je tih istih 16 uzoraka dalo negativne rezultate na 41,5 °C. Također, osam uzoraka je bilo negativno na 37 °C, a pozitivno

na 41,5 °C. Dakle, navedenih 24 uzorka (16 + 8) dalo je nepodudarne, odnosno nesukladne rezultate pri različitim temperaturama prednamnažanja.

Uzorci kod kojih nisu ostvareni isti rezultati primjenom različitih temperatura prednamnažanja utječu na vrijednost Kappa koeficijenta. U tablici 40. prikazana je podudarnost rezultata dokazivanja vrste *V. parahaemolyticus* u uzorcima inkubiranim pri dvjema korištenim temperaturama koja je visoka (Kappa koeficijent 0,6240) i statistički značajna ($P < 0,0001$).

Tablica 40. Kappa koeficijenti između različitih temperatura prednamnažanja za dokazivanje *V. parahaemolyticus* pri temperaturi 37 °C i 41,5 °C

Vrsta	Kappa koeficijent	SE _{Kappa}	P
<i>V. parahaemolyticus</i>	0,6240	0,0608	< 0,0001

U tablici 41. prikazana je podudarnost postignutih rezultata dokazivanja bakterije *V. vulnificus* pri temperaturama 37 °C i 41,5 °C.

Tablica 41. Podudarnost rezultata dokazivanja *V. vulnificus* pri temperaturi od 37 °C i 41,5 °C

Ostvareni rezultat	PCR pretraga <i>V. vulnificus</i>		Podudarni rezultati / broj uzoraka n	Nepodudarni rezultati / broj uzoraka n
	Pozitivan / 37 °C, broj uzoraka n	Negativan / 37 °C, broj uzoraka n		
Pozitivan / 41,5 °C, broj uzoraka n	6*	4**	248*	19**
Negativan / 41,5 °C, broj uzoraka n	15**	242*		
Ukupno uzoraka n			267	

* isti rezultati ostvareni na obje temperature prednamnažanja

** različiti rezultati ostvareni na obje temperature prednamnažanja

Kako vidimo u tablici 41., šest uzoraka je dalo pozitivne rezultate na obje temperature, dok je njih 242 dalo negativne rezultate na obje temperature prednamnažanja, te se na tih 248 uzoraka rezultati savršeno podudaraju. Pozitivne rezultate na 37 °C dalo je 15 uzoraka, a negativne na 41,5 °C, dok su četiri uzorka bila negativna na 37 °C, a pozitivna na 41,5 °C. Navedenih 19 uzoraka (15 + 4) dalo je nepodudarne rezultate primjenom različitih temperatura prednamnažanja.

U tablici 42. prikazana je podudarnost rezultata dokazivanja vrste *V. vulnificus* u uzorcima inkubiranim pri dvjema korištenim temperaturama koja je umjerena (Kappa koeficijent 0,3542) i statistički značajna ($P < 0,0001$).

Tablica 42. Kappa koeficijenti između različitih temperatura prednamnažanja za dokazivanje *V. vulnificus* pri temperaturi 37 °C i 41,5 °C

Vrsta	Kappa koeficijent	SE _{Kappa}	P
<i>V. vulnificus</i>	0,3542	0,0569	< 0,0001

5.2.7. Rezultati dokazivanja prisutnosti gena za kodiranje toksina bakterije *V. parahaemolyticus* u uzorcima nakon prednamnažanja pri temperaturama 41,5 °C i 37 °C

Svi izolati za koje je biokemijskom i PCR pretragom dokazano da su *V. parahaemolyticus*, pretraženi su na prisutnost *tdh* i *trh* gena. Od ukupno 12 izolata bakterije *V. parahaemolyticus*, niti na jednom izolatu nije dokazana prisutnost *tdh* i *trh* gena.

Nasuprot tome, uzorci koji su PCR metodom na prednamnoženim bujonima dokazano pozitivni na bakteriju *V. parahaemolyticus*, pri čemu bakterija nije izolirana mikrobiološkom metodom, dodatno su pretraženi na prisutnost gena za kodiranje toksina, *tdh* i *trh*. Rezultati su prikazani u tablicama 43. i 44.

Tablica 43. Rezultati dokazivanja prisutnosti gena *tdh* i *trh* bakterije *V. parahaemolyticus* u prednamnoženim uzorcima školjkaša pretraženih u razdoblju od 2017. do 2020. godine

GODINA	<i>V. parahaemolyticus</i> 41,5 °C	<i>V. parahaemolyticus</i> 37 °C	<i>tdh</i> n (%)	<i>trh</i> n (%)
2017.	39	-	1 (0,8 %)	3 (2,4 %)
2018.	40	-	0	0
2019.	31	37	1 (0,8 %)	5 (4 %)
2020.	2	4	0	0
Ukupno	112	41	2 (1,6 %)	8 (6,4 %)
Sveukupno	125		10 (8 %)	

Tablica 43. prikazuje učestalost prisutnosti gena za kodiranje toksina bakterije *V. parahaemolyticus*, a koji su dokazani tijekom 2017. i 2019. godine. U dva uzorka (1,6 %) dokazana je prisutnost gena *tdh*, dok je prisutnost gena *trh* utvrđena u njih osam (6,4 %), odnosno, 8 % uzoraka pozitivnih na bakteriju *V. parahaemolyticus* sadržavalo je gene za kodiranje toksina. Ukupan broj uzoraka u kojima je dokazana bakterija *V. parahaemolyticus* je 125 pri čemu su neki uzorci bili pozitivni samo na jednoj temperaturi prednamnažanja.

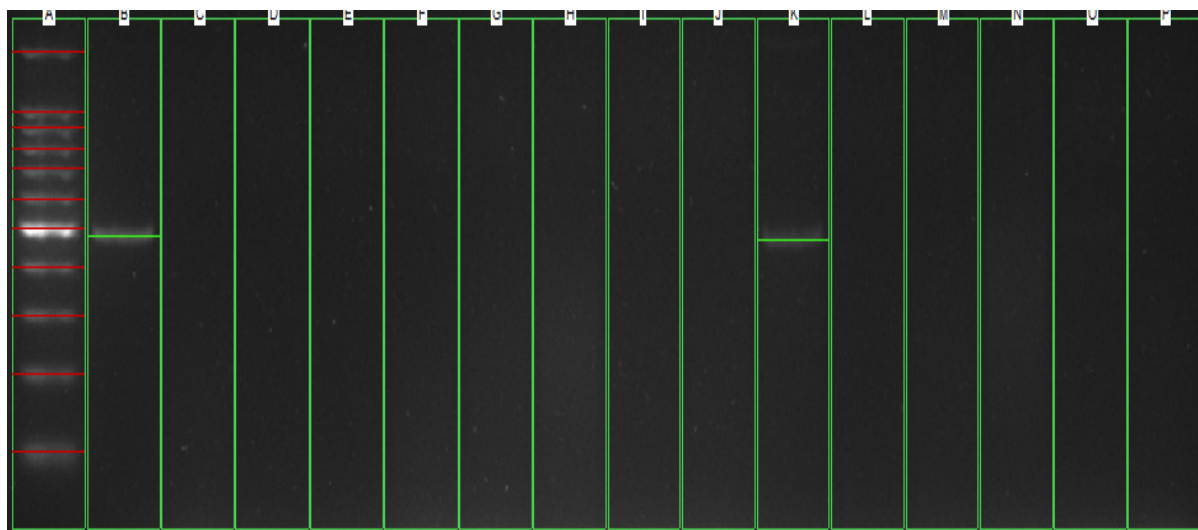
Tablica 44. Rezultati dokaza prisutnosti gena *tdh* i *trh* bakterije *V. parahaemolyticus* prema vrstama školjkaša

Uzorak *	Broj uzoraka	<i>tdh</i> n (%)	<i>trh</i> n (%)
Dagnje	80	1 (1,25 %)	7 (8,75 %)
Kamenice	7	1 (14,29 %)	1 (14,29 %)
Kapice	5	-	-
Kunjke	22	-	-
Prnjavice	6	-	-
Rumenke	5	-	-
Ukupno	125	2 (1,6 %)	8 (6,4 %)

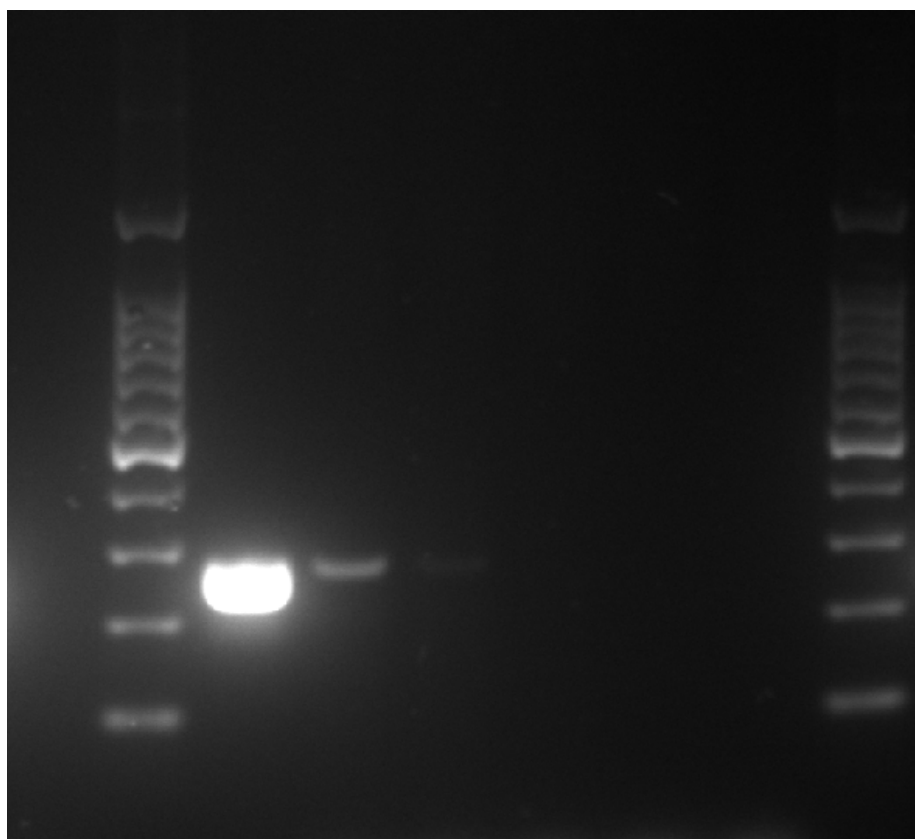
*Živi školjkaši

U tablici 44. prikazani su rezultati uzoraka pozitivnih na prisutnost gena za kodiranje toksina bakterije *V. parahaemolyticus* prema vrstama školjkaša. Navedeni geni dokazani su u uzorcima dviju vrsta školjkaša, u dagnjama i kamenicama.

Na slikama 30. i 31. prikazani su vizualizirani PCR produkti nakon gel elektroforeze. Na slici 30. prikazan je uzorak pozitivan na *trh* gen bakterije *V. parahaemolyticus*, dok su na slici 31. prikazani uzorci pozitivni na *tdh* gen bakterije *V. parahaemolyticus*.



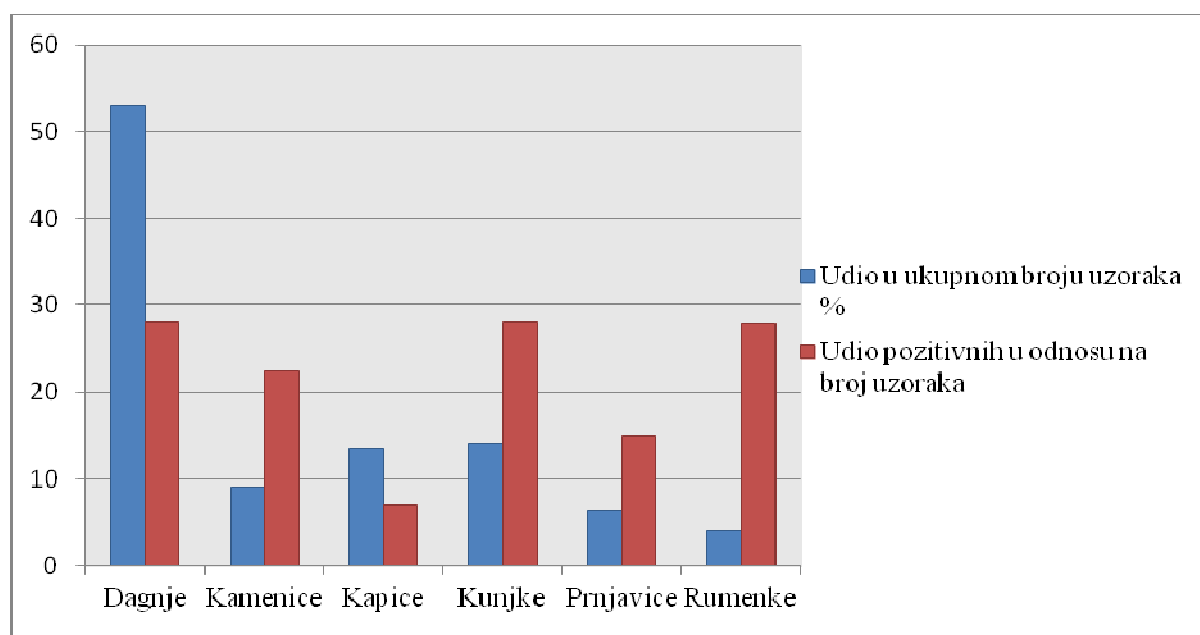
Slika 30. Serija uzoraka pozitivnih na bakteriju *V. parahaemolyticus*, pretraženi na prisutnost *trh* gena: stupac A - DNA marker, stupac B - pozitivna kontrola, stupac K - uzorak pozitivan na *trh* gen bakterije *V. parahaemolyticus*, veličine 500 bp (foto N. Džafić)



Slika 31. Serija uzoraka pozitivnih na bakteriju *V. parahaemolyticus*, pretraženi na prisutnost *tdh* gena: prvi i zadnji stupac DNA marker, drugi stupac - pozitivna kontrola, treći i četvrti stupac - uzorci pozitivni na *tdh* gen bakterije *V. parahaemolyticus*, veličine 269 bp (foto N. Džafić)

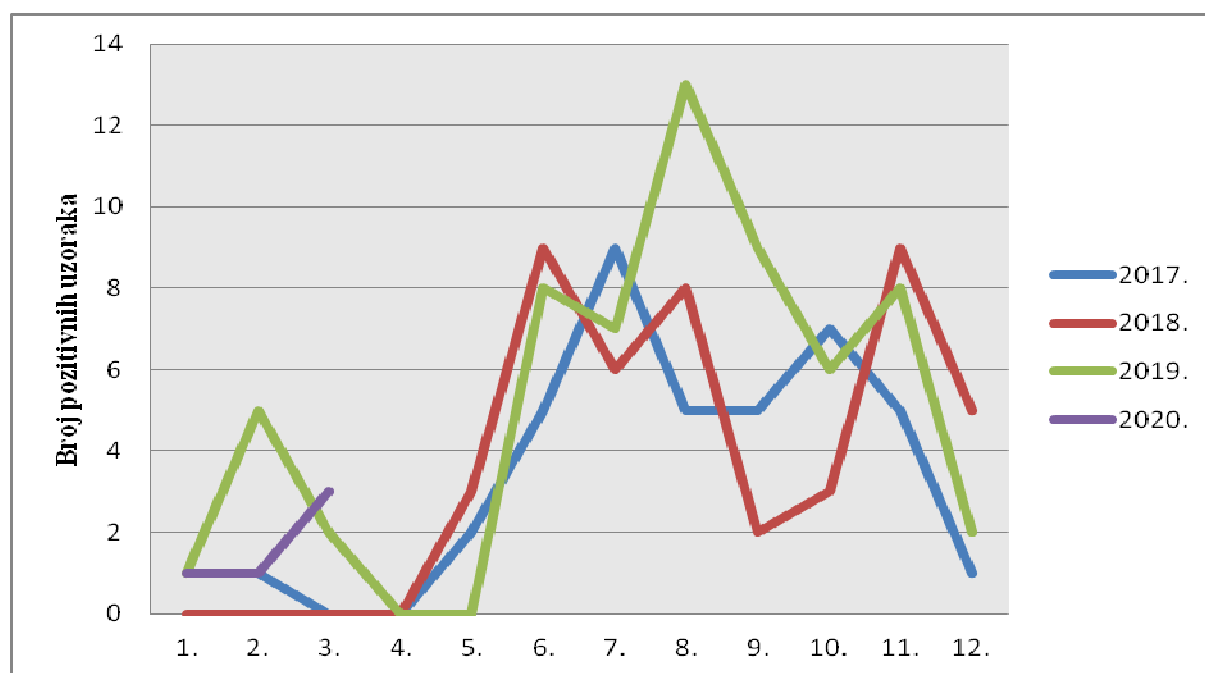
5.2.8. Skupni rezultati pretraživanja mikrobiološkom i PCR metodama za dokaz prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

U grafikonima 1. i 2. te tablicama 45. i 46. prikazani su zbirni rezultati svih pretraga koje su rezultirale dokazom prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp.



Grafikon 1. Učešće različitih vrsta školjkaša u ukupnom broju uzoraka i u udjelu pozitivnih na nalaz potencijalno patogenih *Vibrio* spp.

U grafikonu 1. vidi se kako su najzastupljeniji uzorak živih školjkaša činile dagnje, dok su rumenke bile najmanje zastupljene. U svih vrsta školjkaša dokazani su uzorci pozitivni na prisutnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp. u različitim udjelima. Pri tome je zabilježen podjednaki udio pozitivnih uzoraka u rumenkama, dagnjama i kunjama (28 %, 28,06 % i 28,09 %) dok je najmanji udio pozitivnih uzoraka dokazan u kapticama (7,06 %).



Grafikon 2. Broj pozitivnih uzoraka školjkaša na nalaz potencijalno patogenih *Vibrio* spp. po mjesecima i godinama istraživanja

U grafikonu 2. je prikazan ukupan broj pozitivnih uzoraka na nalaz potencijalno patogenih *Vibrio* spp. po mjesecima tijekom cijelog perioda istraživanja. Većina pozitivnih uzoraka zabilježena je u razdoblju od svibnja do studenog svake pojedinačne godine. Tijekom zime 2019. godine dokazan je neuobičajeni porast broja pozitivnih uzoraka, moguće povezan s pomorskim prometom.

U tablici 45. prikazani su zbirni rezultati mikrobiološke pretrage i PCR-a na nalaz pojedinih vrsta *Vibrio* spp. prema lokacijama uzorkovanja. Od ukupno 632 uzorka školjkaša, njih 267 pretraženo je primjenom dvije temperature prednamnažanja. Za obje pretrage je od 2019. godine uvedena i druga temperatura prednamnažanja, s tim da su rezultati mikrobiološke pretrage prikazani jedinstvenim nalazom.

Tablica 45. Skupni prikaz rezultata pretraživanja školjkaša istarskoga akvatorija s dokazanim potencijalno patogenim *Vibrio* spp. mikrobiološkom i PCR metodom

Lokacija	Mikrobiološka pretraga*					PCR pretraga				
	Broj uzoraka 41,5 °C	V.ch. n (%)	V.p. n (%)	V.v. n (%)	V. ch. n (%)	V.p. 41,5 °C n (%)	V.v. 41,5 °C n (%)	Broj uzoraka 37 °C	V. p. 37 °C n (%)	V.v. 37 °C n (%)
L1 - I	34	0	1 (2,94)	0	0	5 (14,71)	0	14	2 (14,29)	1 (7,14)
L2 - I	28	0	0	1 (3,57)	0	0	2 (7,14)	11	1 (9,09)	2 (18,18)
L3 - Z	38	0	2 (5,26)	0	0	13 (34,21)	5 (13,16)	17	3 (17,65)	3 (17,65)
L4 - Z	38	0	1 (2,63)	0	1 (2,63)	10 (26,32)	2 (5,26)	16	4 (25,00)	1 (6,25)
L5 - Z	38	0	0	0	1 (2,63)	12 (31,58)	4 (10,53)	16	3 (18,75)	2 (12,50)
L6 - I	34	0	0	0	1 (2,94)	3 (8,82)	0	15	3 (13,33)	0
L7 - I	34	0	2 (5,88)	0	1 (2,94)	9 (26,47)	3 (8,82)	15	6 (40,00)	1 (6,67)
L8 - Z	38	0	1 (2,63)	0	0	3 (7,89)	0	16	3 (18,75)	2 (12,50)
L9 - I	34	0	0	1 (2,94)	0	5 (14,71)	1 (2,94)	15	2 (20,00)	0
L10 - Z	36	0	0	0	1 (2,78)	6 (16,67)	2 (5,56)	15	1 (6,67)	2 (13,33)
L11 - Z	38	0	2 (5,63)	0	0	9 (23,68)	1 (2,63)	16	3 (18,75)	2 (12,50)
L12 - Z	37	1 (2,7)	2 (5,45)	0	1 (2,7)	13 (35,14)	3 (8,11)	16	4 (25,00)	2 (5,45)
L13 - Z	32	0	1 (3,13)	0	0	4 (12,5)	0	13	0	1 (7,69)
L14 - Z	33	0	0	0	0	5 (15,15)	1 (3,03)	14	0	0
L15 -Z	37	0	0	0	0	9 (24,32)	1 (2,7)	16	4	1 (6,25)
L16 - Z	35	0	0	0	0	0	0	14	0	0
L17 - Z	33	0	0	0	0	4 (12,12)	0	14	0	1 (7,14)
L18 - Z	35	0	0	0	0	2 (5,71)	0	14	2 (14,29)	0
UKUPNO	632	1 (0,16)	12 (1,9)	2 (0,32)	6 (0,95)	112 (17,72)	25 (3,96)	267	41 (15,36)	21 (7,87)

*HRN EN ISO 21872-1:20017

V.ch. = *Vibrio choleare*; V.p.= *Vibrio parahaemolyticus*; V.v.= *Vibrio vulnificus*

Iz tablice 45. vidljivo je da je na ukupno pet lokacija (L4 – Z, L5 – Z, L7 – I, L10 - Z i L12 - Z) dokazana prisutnost svih istraživanih bakterija, dok samo na jednoj lokaciji (L16 – Z) prisutnost ovih bakterijskih vrsta nije dokazana.

Tablica 46. Skupni rezultati PCR pretraga uzoraka školjkaša u kojima su dokazani potencijalno patogeni *Vibrio* spp. po vrstama školjkaša

Uzorak *	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
		41,5 °C	37 °C	41,5 °C	37 °C
Dagnje	5	71	28	18	13
Kamenice	0	6	5	2	4
Kapice	0	5	0	0	1
Kunjke	1	19	6	3	2
Prnjavice	0	6	0	1	0
Rumenke	0	5	2	1	1
Ukupno	6	112	41	25	21

*Živi školjkaši

U tablici 46. prikazani su skupni pozitivni rezultati PCR pretraga prema vrstama školjkaša. Uočava se najveći broj uzoraka pozitivnih na prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus* (nakon prednamnažanja na temperaturi 41,5 °C). Najmanji broj uzoraka bio je pozitivan na prisutnost bakterije *V. cholerae*.

6. RASPRAVA

Zdravstvena ispravnost školjkaša osigurava se redovnim kontrolama mikrobiološkog onečišćenja praćenjem najvjerojatnijeg broja bakterije *E. coli*, potom praćenjem pojavnosti morskih biotoksina, teških metala i benzo(a)pirena, dok je učestalost pojave, kao i zoonotski potencijal prirodno prisutnih moguće patogenih pripadnika roda *Vibrio* u Republici Hrvatskoj nepoznata.

Ovim radom obuhvaćene su tri vrste potencijalno patogenih bakterija roda *Vibrio*, koje su molekularnim metodama dokazane u 151 uzorku školjkaša (n=632), odnosno u 23,89 % pretraženih uzoraka, što je u skladu s rezultatima OTTAVIANIA i sur. (2005.), koji su ustanovili prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus* u 24,31 % uzoraka s odobrenih uzgajališta na području središnje Italije. Naši rezultati su podudarni i s rezultatima istraživanja SUFFREDINIA i sur. (2014.) koji su dokazali prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus* u 27,5 % uzoraka školjkaša iz regije Veneto. U ranijim istraživanjima u Hrvatskoj prisutnost *Vibrio* spp. dokazana je u 9,3 % uzoraka morskih plodova (IVEZIĆ-JAKŠIĆ, 1986.) odnosno 27 % uzoraka školjkaša (JAKŠIĆ i sur., 2002.). Manji dio naših pozitivnih uzoraka nađen je u hladnijem dijelu godine, tijekom siječnja i veljače, što se podudara s rezultatima koje su objavili VERNOCCHI i sur. (2007.) i DI PINTO i sur. (2008.) koji su bakteriju *V. parahaemolyticus* izdvojili iz uzoraka tijekom zimskih mjeseci. Najveći udio pozitivnih uzoraka školjkaša u našem je istraživanju zabilježen u toplijem dijelu godine (grafikon 2.), što je posljedica distribucije *Vibrio* spp. u morskoj vodi koja ovisi o temperaturi te dostupnosti hranjivih tvari (KANEKO i COLWELL, 1973.; SU i LIU, 2007.; HARRIS i sur. 2012.; HUQ i sur., 2013.), za razliku od hladnijih zimskih mjeseci kada se navedene vrste ne mogu dokazati mikrobiološkim metodama dokazivanja, jer se nalaze u "*viable but nonculturable state*" (VBNC) stanju.

Mikrobiološkom pretragom uzoraka školjkaša dokazali smo 15 (2,37 %) pozitivnih uzoraka (tablica 13.), dok su rezultati postignuti primjenom PCR metoda uz primjenu dviju temperatura prednamnažanja (tablica 45.) rezultirali dokazivanjem 151 pozitivnog uzorka (23,89 %). Opažena razlika u postignutim rezultatima primjenom različitih postupaka pretraživanja, moguća je posljedica slabe selektivnosti korištenog TCBS agara, na koju je ukazano u nekoliko navrata (LOTZ i sur. 1983.; KITAURA i sur., 1983.; MASSAD i OLIVER, 1987.). U radu IVEZIĆ-JAKŠIĆ (1986.) ustanovljeno je da bakterija *V.*

alginolyticus djeluje antagonistički na rast bakterije *V. parahaemolyticus* u njihovoj miješanoj kulturi porasloj na TCBS agaru, za što autorica nije našla potvrdu u dostupnoj literaturi. U našem se istraživanju na TCBS agaru najčešće uočavao obilan rast velikih žutih kolonija bakterije *V. alginolyticus*, koja je tijekom toplijeg vremenskog razdoblja očito dominantna vrsta u školjkašima s obuhvaćenog područja istraživanja, a što je podudarno s rezultatima CAVALLO i STABILI (2002.), koji su utvrdili kako je najčešće izdvojena vrsta u uzorcima školjkaša iz roda *Vibrio* u Italiji upravo *V. alginolyticus*.

Drugi korišteni agar po izboru laboratorija, prema normi HRN EN ISO 21872-1:2017 (ANONIMNO, 2017.), treba biti komplementaran TCBS agaru. U našem istraživanju korišten je kromogeni CHROMagar™*Vibrio*, na kojem smo izdvojili bakteriju *V. cholerae* iz uzorka u siječnju 2019. godine, pri temperaturi mora od 11,2 °C (tablica 16.), što je sukladno spoznaji kako se te bakterije mogu umnažati pri temperaturama od 10 °C do 30 °C (HARRIS i sur. 2012.). O nalazu bakterije *V. cholerae* izvijestili su ČANAK i sur. (2018.) koji su je izdvojili iz uzorka crijeva i želuca lubina, te RIPABELLI i sur. (1999.) koji su tu bakteriju dokazali u 1,6 % uzoraka dagnji na talijanskom području Jadrana. Našim istraživanjem živih školjkaša prikazan je dokaz prisutnosti bakterije *V. cholerae* koji je prvi takav nalaz na uzorcima školjkaša iz proizvodnih područja Republike Hrvatske. Zanimljivo je da u ovom uzorku nije evidentirana prisutnost ostalih bakterija iz roda *Vibrio*, odnosno, porast bakterije *V. cholerae* bio je u čistoj kulturi. S obzirom na granične vrijednosti temperature mora u trenutku uzorkovanja ovog uzorka kunjki, te lokaciju porijekla uzorka u blizini plovnoga puta, može se pretpostaviti da je tome prethodio prolazak plovila koje je ispustilo onečišćene balastne vode, a one mogu biti izvorom mikrobiološkog onečišćenja (KRSTULOVIĆ i ŠOLIĆ, 1997.). Evaluirajući rezultate postignute mikrobiološke pretrage prema vrsti školjkaša (tablica 13.), lokaciji porijekla uzorka (tablica 14.), te godini uzorkovanja (tablica 15.) nisu opažene statistički značajne razlike. Međutim, uočena je statistički značajna razlika ($P = 0,0005$) u srednjim vrijednostima temperature mora pri uzimanju uzoraka povezana s postignutim rezultatima, kao i u srednjim vrijednostima temperature zraka ($P = 0,0031$) (tablica 17.).

Primjenom PCR metode za dokazivanje genoma bakterije *V. cholerae* dokazali smo ukupno šest (0,95 %) pozitivnih uzoraka (tablice 18. i 19.), pri čemu nisu utvrđene statistički značajne razlike u pojavnosti bakterije *V. cholerae* između različitih vrsta živih školjkaša, niti između različitih lokacija uzorkovanja. Također, nije bilo statistički značajnih razlika s obzirom na godine uzorkovanja (tablica 20.). Međutim, usporedbom temperatura zraka,

ustanovljena je statistički značajna razlika u srednoj vrijednosti temperature zraka kod negativnih i pozitivnih uzoraka. Interesantno je za spomenuti da smo u četiri od šest uzoraka pozitivnih na bakteriju *V. cholerae* istovremeno utvrdili i bakteriju *V. parahaemolyticus*, pri čemu je jedan uzorak bio pozitivan na prisutnost *trh* gena. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost istovremenog akumuliranja različitih patogena u tkivima i organima školjkaša tijekom prirodnog procesa hranjenja (MEAD i sur., 1999.; LEES, 2000.; ČADEŽ i TESKEREDŽIĆ, 2005.; RIBARIĆ i sur., 2011.).

S obzirom na to da se bakterije roda *Vibrio* u povoljnim uvjetima vrlo brzo umnažaju, kroz 8 do 9 minuta (BAKER-AUSTIN i sur., 2017.), zabrinjavajuće je u uzorcima živih školjkaša dokazati prisutnost bakterije *V. cholerae*, neovisno o tome kojem serotipu pripadaju, jer i drugi serotipovi (non-O1 i non-O139) mogu uzrokovati blagi do teški oblik gastroenteritisa (de MAGNY i sur. 2011.; RUKAVINA, 2013.).

U uzorcima u kojima je utvrđena prisutnost bakterije *V. cholerae*, najvjerojatniji broj *E. coli* kretao se u rasponu od < 18 do 16 000 cfu/100 g (rezultati nisu prikazani, ali su dostupni u laboratorijskoj dokumentaciji). Uzorak u kojem je vrijednost broja *E. coli* bila 16 000 cfu/100 g rezultirao je opozivom školjkaša s tržišta i zabranom stavljanja na tržište bez prethodno provedenog postupka pročišćavanja. Poznato je da se školjkaši relativno brzo očiste od bakterije *E. coli*, no za pripadnike roda *Vibrio* potrebno je puno više vremena, čak do osam dana (MARINO i sur., 2005.; PINTO i sur., 2008.; LOPEZ-JOVEN i sur., 2011.; SUREET i sur., 2012.). Taj dugotrajni postupak pročišćavanja posljedica je snažnog pričvršćivanja bakterije na probavni trakt školjkaša (SUITZA i sur., 2009.), čime je postupak pročišćavanja praktički neprimjenjiv za školjkaše kontaminirane bakterijama roda *Vibrio*.

Molekularnom metodom (PCR) dokazivanja prisutnosti genoma bakterije *V. parahaemolyticus* ustanovili smo 112 (17,72 %) pozitivnih uzoraka primjenom temperature prednamnažanja 41,5 °C, kako je prikazano u tablicama 22., 23. i 24. U drugoj fazi istraživanja, uključivanjem druge temperature prednamnažanja, pretraženo je 267 uzoraka, koji su nakon prednamnažanja pri 37 °C pokazali 41 (15,36 %) pozitivni rezultat (tablica 31.), u odnosu na 33 pozitivna, koliko je dokazano u istim uzorcima, nakon prednamnažanja pri 41,5 °C (tablica 24., zbroj pozitivnih uzoraka tijekom 2019. i 2020. godine). Podudarnost rezultata ostvarenih pri obje korištene temperature je visoka (tablica 39. i 40.), ali nije savršena (Kappa koeficijent 0,6240), pa bi se jedan dio pozitivnih uzoraka izgubio ako bi se koristila samo jedna temperatura. Drugim riječima, korištenjem obje temperature povećava

se osjetljivost metode dokazivanja prisutnosti bakterije *V. parahaemolyticus*. Ovi rezultati su na tragu prikazanog u radu ROSEC i sur. (2012.) koji smatraju da je temperatura inkubacije od 41,5 °C previsoka i da ometa rast bakterije *V. parahaemolyticus*.

Najviša učestalost dokaza bakterije *V. parahaemolyticus* u našem istraživanju je bila u kunjkama i dagnjama (21,35 % i 21,19 %), a najniža u kopicama i kamenicama (5,88 % i 10,34 %) što je prikazano u tablici 22. Nadalje, uočene su značajne razlike u učestalosti dokazivanja između različitih lokaliteta uzorkovanja (tablica 23.). Tako je najviša učestalost dokazivanja vrste *V. parahaemolyticus* ustanovljena na lokaciji L12 – Z (35,14 % pozitivnih uzoraka), potom na lokacijama L3 - Z (34,21 %), L5 - Z (31,58 %) i L4 - Z (26,32 %), sve smještene na zapadnoj obali istarskoga akvatorija. Također, značajna razlika je uočena u srednjim vrijednostima temperatura mora na mjestu i u vrijeme uzimanja uzoraka u kojima je dokazana vrsta *V. parahaemolyticus* pri čemu je srednja vrijednost temperature mora kod pozitivnih uzoraka iznosila 22,04 °C (tablica 25.), čime je potvrđena ovisnost incidencije bakterije s temperaturom vode (KANEKO i COLWELL, 1973.; SU i LIU, 2007.). Statistički značajna razlika uočena je u srednjim vrijednostima temperature zraka, gdje je srednja vrijednost temperature zraka kod pozitivnih uzoraka iznosila 19,28 °C, a kod negativnih 14,81 °C (tablica 25.). Uvjeti skladištenja pri temperaturama do 26 °C pogoduju naglom umnažanju bakterije *V. parahaemolyticus* za 50 do 790 puta od početne vrijednost tijekom 24 sata (SU i LIU, 2007.), što u ovakvim okolišnim uvjetima ostavlja mogućnost značajnog umnažanja prisutnih bakterija roda *Vibrio*. Također, značajna je mogućnost križne kontaminacije između kontaminiranih i nekontaminiranih školjkaša, te je potrebno stalno poboljšavati higijenske postupke tijekom distribucije do konzumacije (HARA-KUDO i sur., 2012.). U tablici 26. prikazan je omjer izgleda (OR – *odds ratio*) za dokazivanje vrste *V. parahaemolyticus* koji je 5,18 puta veći ako je temperatura mora iznad 15 °C ($P < 0,001$), pri čemu nije statistički povezan s godinom promatranja niti s lokacijom uzorkovanja na istočnoj ili zapadnoj obali.

Za uzorke školjkaša inkubirane na temperaturi od 37 °C uočena je najviša učestalost dokaza u rumenkama i dagnjama (tablica 31.), a promatrajući različite lokacije, najučestaliji pozitivan nalaz bakterije *V. parahaemolyticus* bio je na lokaciji L7 – I (tablica 32.). Kao i u slučaju prednamnažanja samo na temperaturi 41,5 °C, i ovdje je uočena značajna razlika u temperaturama mora i zraka kod pozitivnih uzoraka u odnosu na negativne (tablica 34.), što potvrđuje ovisnost pojave bakterije s temperaturom vode (KANEKO i COLWELL, 1973.; SU i LIU, 2007.).

Izolati bakterije *V. parahaemolyticus* pretraženi su na prisutnost gena za kodiranje toksina, *tdh* i *trh*. Niti jedan izolat nije bio pozitivan na prisutnost gena za kodiranje toksina, što je u skladu s istraživanjima koja redom potvrđuju manju učestalost patogenih sojeva ove bakterije u okolišnim uzorcima i školjkašima (OTTAVIANI i sur., 2005.; LEE i sur., 2008.; RAGHUNAT i sur., 2008.; ZHAO i sur., 2011.; SUFFREDINI i sur., 2014.).

Svi uzorci koji su PCR metodom bili pozitivni na bakteriju *V. parahaemolyticus*, dodatno su pretraženi na prisutnost gena za kodiranje toksina, *tdh* i *trh*. U dva uzorka (1,6 %) utvrđena je prisutnost gena *tdh*, dok je prisutnost gena *trh* utvrđena u osam (6,4 %) uzoraka, odnosno, ukupno 8 % uzoraka pozitivnih na bakteriju *V. parahaemolyticus* sadržavalo je gene za kodiranje toksina (tablica 43.). Geni za kodiranje toksina *tdh* i *trh* dokazani su samo u uzorcima dagnji i kamenicama, dok u ostalim vrstama školjkaša nisu dokazani (tablica 44.) Ukupan broj uzoraka u kojima je dokazana bakterija *V. parahaemolyticus* je 125 pri čemu su neki uzorci bili pozitivni samo na jednoj temperaturi prednamnažanja. U dosadašnjim istraživanjima školjkaša na području Republike Hrvatske (IVEZIĆ-JAKŠIĆ, 1986.; JAKŠIĆ i sur., 2002.; MIKUŠ i sur., 2010.; ČANAK i sur., 2018.) dokazano je prisustvo bakterije *V. parahaemolyticus*, a ovo je prvi dokaz prisutnosti gena za kodiranje toksina, *tdh* i *trh* na hrvatskom dijelu Jadrana. Naši su rezultati podudarni s nalazima koje su objavili OTTAVIANI i sur.(2005.), koji su od 35 pozitivnih uzoraka na bakteriju *V. parahaemolyticus* utvrdili jedan odnosno tri pozitivna uzorka na *tdh* i *trh* gene.

Genom bakterije *V. vulnificus* dokazan je PCR postupkom u 25 uzoraka nakon prednamnažanja na temperaturi od 41,5 °C (tablica 27.). Uz primjenu temperature prednamnažanja od 37 °C bakterija je dokazana u 21 uzorku (tablica 35.), s tim da je podudarnost rezultata pri dvjema korištenim temperaturama umjerena (0,3542) (tablica 41.). Uspoređujući podatake za 2019. godinu vidi se značajno veći broj pozitivnih uzoraka (21) nakon prednamnažanja na 37 °C (prikazano u tablici 37.) u odnosu na broj uzoraka (10) koji su dokazano pozitivni korištenjem temperature od 41,5 °C (tablica 29.). Pri tome su samo 4 uzorka bila pozitivna primjenom temperature od 41,5 °C, a primjenom temperature od 37 °C nije dokazan genom bakterije *V. vulnificus* (tablica 41.). To je u skladu s ISO normom koja za poboljšano dokazivanje bakterije *V. vulnificus* zahtijeva inkubaciju bujonskih kultura na 37 °C (ANONIMNO, 2017.). Sveukupno, primjenom obje temperature prednamnažanja dokazano je 40 (6,33 %) pozitivnih uzoraka što je manja učestalost u odnosu na rezultate RIPABELLIA i sur. (1999.), koji su našli 17,7 % pozitivnih, a više od rezultata

NORMANNA i sur. (2006.) koji su dokazali bakteriju *V. vulnificus* u 2,83 % uzoraka i više od rezultata IVEZIĆ-JAKŠIĆ (1986.) gdje je nađeno 2,7 % pozitivnih uzoraka.

U našem istraživanju nisu uočene značajne razlike u učestalosti izdvajanja bakterije *V. vulnificus* s obzirom na vrstu živih školjkaša (tablica 27. i 35.), ali su uočene statistički značajne razlike s obzirom na lokaciju. Tako je najviša učestalost utvrđena na lokaciji L3 - Z (13,16 %), dok na 7 lokacija ova vrsta nije dokazana (tablica 28.). Kao i u slučaju bakterije *V. parahaemolyticus*, uočene su statistički značajne razlike u temperaturi mora kod pozitivnih i negativnih uzoraka te u temperaturi zraka (tablica 30.). Primjenom temperature prednamnažaja od 37 °C uočena je najviša učestalost dokazivanja vrste *V. vulnificus* na lokaciji L2 - I (18,18 %), dok na pet lokacija nije dokazana (tablica 36.).

Uspoređujući sve postignute rezultate prema lokacijama uzorkovanja, prikazane u tablici 45., uočava se pet lokacija na kojima je dokazana prisutnost svih praćenih potencijalno patogenih vibrija. U tri slučaja radi se o lokacijama smještenima u zaljevima koji ulaze duboko u kopno. To su lokacije L4 – Z, L5 – Z i L7 – I. Jedna lokacija je zatvorena uvala (L10 – Z), a jedna lokacija je smještena u priobalnom dijelu, na otvorenom moru (L12 – Z). Od ukupno 18 lokacija samo na jednoj nije dokazana prisutnost niti jedne od praćenih bakterijskih vrsta (L16 – Z).

Rezultati svih pozitivnih uzoraka prema vrstama školjkaša prikazani grafikonom 1. ukazuju na podjednak udio pozitivnih uzoraka kod rumenki, dagnji i kunjki s tim da treba imati na umu da su dagnje iz uzgojnih područja, koja su u pravilu bliže obali radi laške dostupnosti i uzgajaju se na konopima u vertikalnim linijama. Preostale dvije vrste, rumenke i kunjke su pridnene vrste koje potječu iz izlovnih područja, a izlovljavaju se ronjenjem i povlačenjem ribolovnih alata po dnu. S obzirom na način preživljavanja *Vibrio* spp. u nepovoljnim uvjetima u tzv. "*viable but nonculturable state*" i zadržavanju u sedimentu (KANEKO i COLWELL, 1973.; SU i LIU, 2007.; HARRIS i sur. 2012.; HUQ i sur., 2013.), bilo bi za očekivati da će i kapice i prnjavice imati podjednaki udio u pozitivnim rezultatima, jer su istovremeno izložene istim bakterijama koje filtriraju i bioakumuliraju u organima. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost odabira vrste školjkaša za potrebe praćenja prisutnosti potencijalno patogenih vibrija na izlovnim područjima gdje se izlovljavaju različite vrste školjkaša.

Od 2014. godine EFSA-ina izvješća navode pojave epidemija prouzročenih bakterijama roda *Vibrio* u Francuskoj, Italiji i Španjolskoj. U RH nema evidentiranih oboljenja prouzročenih *Vibrio* spp. (Kurečić Filipović, 2017.).

U Republici Hrvatskoj postoji zakonska obveza prijave oboljenja uzrokovanog bakterijom *V. cholerae* (ANONIMNO, 2007.; ANONIMNO 2014.). Neovisno što do sada nemamo evidentiranih oboljenja koja bi se mogla povezati s pojavom bakterija roda *Vibrio* u školjkašima, izgledno je kako će ih u budućnosti biti. Dio Jadrana obuhvaćen ovim istraživanjem ima najniže površinske temperature mora u siječnju, veljači i ožujku, u prosjeku oko 10 °C do 12 °C (podatci DHMZ nisu prikazani). Već tijekom travnja, vrijednost temperature se kreće od 13 °C do 15 °C, a maksimum postiže u lipnju, srpnju i kolovozu kada su prosječne površinske temperature u rasponu od 24 °C do 27 °C. Temperatura mora ostaje iznad 15 °C u pravilu do kraja studenog ili početka prosinca, što ukupno daje 7 do 8 mjeseci godišnje s uvjetima koji pogoduju bakterijama roda *Vibrio*. Visoke temperature mora pogoduju "cvjetanju mora" odnosno bujanju fitoplanktonskih zajednica, nakon čega slijedi i proliferacija zooplanktonskih zajednica, te konačno i povećanje brojnosti *Vibrio* vrsta (HUQ i sur., 1983.; LIPP i sur., 2002.; SUITZA i sur., 2009.; HARRIS i sur., 2012.). Uočljiv prikaz ovog "bujanja" života u moru istarskoga akvatorija dan je grafikonom 2. gdje se jasno vidi grupiranje pozitivnih nalaza u najtoplijem dijelu godine. U istom grafikonu možemo uočiti zanimljiv pik pozitivnih uzoraka tijekom siječnja i veljače 2019. godine, kada je srednja vrijednost površinske temperature mora iznosila 10,6 °C odnosno 10,3 °C. To su prilično niske vrijednosti temperature mora, pa je za pretpostaviti da je na ove rezultate utjecao pomorski promet.

Mnogi autori koji su istraživali pojavnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp. su ustanovili kako pojavnost ovih bakterijskih vrsta nije u korelaciji s najvjerojatnijim brojem bakterije *E. coli* (NORMANNO i sur., 2006.; LHAFI i KÜHNE, 2007.; CLEMENTS i sur., 2015.) kao obveznim mikrobiološkim kriterijem na temelju kojeg se određuje postupanje s izlovljenim školjkašima. Prikupljeni podatci našeg istraživanja nedvojbeno ukazuju na prisutnost potencijalno patogenih *Vibrio* vrsta u školjkašima iz proizvodnih područja uključenima u ovo istraživanje, te je očigledno da se školjkaši kontaminirani *Vibrio* spp. plasiraju na tržište.

Smatramo važnim još jednom naglasiti razlike u rezultatima našeg istraživanja koje smo ostvarili primjenom standardne mikrobiološke metode u odnosu na one ostvarene

primjenom molekularnih metoda. Dok je mikrobiološka metoda rezultirala dokazom 2,3 % uzoraka pozitivnih na prisutnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp., PCR metodama dokazali smo prisutnost 23,89 % pozitivnih uzoraka školjkaša, što je deseterostruko veća učestalost. Primjenom samo mikrobiološke metode moguće je ostvariti lažno negativne rezultate, i time umanjiti zoonotski značaj i potencijalnu opasnost koju ove bakterijske vrste predstavljaju za javno zdravlje. Umjetno kontaminirani uzorci zahtijevaju visoki nivo kontaminacije da bi se postigli pozitivni rezultati mikrobiološkom metodom pretraživanja (dva od tri ispitivana soja *V. parahaemolyticus* nisu potvrđena mikrobiološkom metodom pri kontaminaciji od 44 do 74 cfu/g; ROSEC i sur., 2009.), dok je PCR metodom dokazana prisutnost svih ispitivanih sojeva i u najnižem nivou kontaminacije od 1 - 6 cfu/g. Uspješnost PCR metoda leži u činjenici što se u našem istraživanju, kao i u istraživanjima drugih autora (ROSEC i sur., 2009; ROSEC i sur. 2012.) primjenjuje nakon postupka prednamnažanja uzorka. Prvo prednamnažanje uzorka se priprema na način da se u 225 ml ASPV nacijepi 25 g uzorka, te se nakon inkubacije precijepi 1 ml prednamnoženog uzorka u 10 ml ASPV-a. Postupkom prednamnažanja kroz dva koraka postiže se traženo umnažanje ciljanih bakterijskih vrsta, uz istovremeno uklanjanje inhibicijskog učinka tkiva školjkaša na PCR. Time se osiguravaju optimalni uvjeti za molekularne metode pretraživanja, dok je "izazov" za mikrobiološku metodu namnažanje ostalih bakterijskih vrsta koje su prisutne u uzorku, i koje mogu prikriti ili čak antagonistički djelovati na rast ciljanih *Vibrio* spp. (IVEZIĆ-JAKŠIĆ, 1986.). Za razliku od navedenog, uzorci koji se distribuiraju u postupcima međulaboratorijskih usporednih testiranja (*proficiency test*), obično se sastoje od matriksa koje je jednostavno pripremiti (npr. dehidrirani ili kuhani račići), te ciljanog mikroorganizma u obliku liofilizata, bez konkurentskih bakterija, te je u takvim uzorcima lakše dokazati tražene bakterijske vrste mikrobiološkom metodom pretraživanja.

S obzirom na naše rezultate istraživanja školjkaša, s osvrtom na njihovu anatomiju i fiziologiju, način života u morskoj vodi, a uz intenzivan utjecaj čovjeka na okoliš u smislu promjene klimatskih uvjeta, te intenzivnog razvoja turizma i pomorskog prometa, smatramo potrebnim pratiti pojavnost potencijalno patogenih *Vibrio* spp. Time možemo utjecati na poboljšanje javnog zdravlja uvođenjem sustavnog praćenja odnosno monitoringa potencijalno patogenih *Vibrio* spp. u školjkašima, prije dokumentirane pojave bolesti u ljudi.

Temeljem rezultata našeg istraživanja i dostupnih literaturnih podataka, možemo predložiti postupak monitoringa prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp.:

PRIJEDLOG MONITORINGA PRISUTNOSTI POTENCIJALNO PATOGENIH *Vibrio* spp. NA PROIZVODNIM PODRUČJIMA ISTARSKOGA AKVATORIJA

Praćenje treba biti organizirano u razdoblju godine u kojem su temperature mora iznad 15 °C, što je potrebno ustanoviti putem dostupnih podataka DHMZ-a, odnosno u budućnosti praćenjem objava na ECDC geoportalu (<https://geoportal.ecdc.europa.eu/vibriomapviewer/>) koji daje temperature mora specifično vezanih na pojavnost bakterija roda *Vibrio*. Također, temperatura mora treba biti evidentirana tijekom uzorkovanja za potrebe realizacije Plana praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša, od strane ovlaštenih veterinarara.

Predlažemo da se uzorkovanje provede jednom mjesečno na svim točkama koje su navedene u Planu praćenja.

Nadalje, predlažemo primjenu standardne metode HRN EN ISO 21872-1:2017., uz istodobnu primjenu molekularne metode (PCR). U slučaju dokaza prisutnosti bakterija *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* *tdh+* i/ili *trh+* te *V. vulnificus*, predlažemo zabranu izlova i opoziv s tržišta te ponavljanje uzorkovanja i ispitivanja navedenim metodama jednom tjedno do dobivanja negativnog rezultata.

Za potrebe ovog programa potrebno je uzorkovati sve vrste školjkaša koje se uzgajaju u pojedinom uzgojnom području.

U izlovnim područjima predlažemo korištenje kunjki i/ili rumenki kao indikatorskih vrsta.

Ukoliko je neko područje zatvoreno radi prisutnosti biotoksina predlažemo odgađanje uzorkovanja do trenutka otvaranja navedenog područja.

Ukoliko je na nekom području određeno pročišćavanje školjkaša radi povećanih vrijednosti MPN *E. coli*, predlažemo obaviti uzorkovanje prema uobičajenom rasporedu. Ako se u navedenim okolnostima ustanovi i prisutnost uzoraka pozitivnih na potencijalno patogene *Vibrio* spp., predlažemo ukidanje mjere pročišćavanja školjkaša, te uvođenje mjere zabrane izlova do dobivanja negativnih rezultata na prisutnost *Vibrio* spp.

7. ZAKLJUČCI

- Rezultati istraživanja ukazuju na prisutnost *Vibrio* vrsta u gotovo cijelom istarskom akvatoriju. Od 18 lokacija samo na jednoj lokaciji prisutnost *Vibrio* spp. nije dokazana, a na njih pet je dokazana prisutnost svih praćenih bakterija.
- Ustanovljena prevalencija potencijalno patogenih *Vibrio* spp. deset puta je veća primjenom molekularnih metoda na uzorcima iz prednamnažanja (23,89 %), u odnosu na standardnu mikrobiološku metodu (2,37 %).
- Standardnom mikrobiološkom metodom izdvojena je bakterija *V. cholerae* u uzorku kunjki, što je prvi zabilježeni izolat te bakterije iz školjkaša u RH. PCR metodom za dokazivanje bakterije *V. cholerae* u uzorcima dagnji iz prednamnažanja ustanovljena je prevalencija od 0,95 %, što je prvi podatak o prevalenciji te bakterijske vrste u školjkašima u RH.
- Standardnom mikrobiološkom metodom izdvojeno je 12 izolata bakterije *V. parahaemolyticus*, dok je PCR metodom ustanovljena prevalencija od 17,72 % odnosno 15,36 % pri temperaturi prednamnažanja od 41,5 °C i 37 °C. Od ukupnog broja pozitivnih uzoraka na prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus* geni *tdh* i *trh* utvrđeni su u 1,6 % odnosno 6,4 % slučajeva. To je ujedno prvi dokaz prisutnosti *tdh*+ bakterije *V. parahaemolyticus* i *trh*+ bakterije *V. parahaemolyticus* u RH.
- Standardnom mikrobiološkom metodom izdvojena su dva izolata bakterije *V. vulnificus*, dok je PCR metodom za dokazivanje genoma bakterije *V. vulnificus* utvrđena prosječna prevalencija od 3,96 % odnosno 7,87 % pri temperaturi prednamnažanja od 41,5 °C i 37 °C.
- Tijekom istraživanja uočene su statistički značajne razlike u temperaturama mora i zraka pri uzorkovanju uzoraka u kojima je dokazana prisutnost *Vibrio* spp. Izgledi za dokazivanje vrste *V. parahaemolyticus* dokazano su 5,18 puta veći ako je temperatura mora iznad 15 °C ($P < 0,001$). U izlovnim područjima u kojima se izlovljava više različitih vrsta školjkaša uočen je veći udio pozitivnih uzoraka kunjki i rumenki. Ove spoznaje vrijedne su za određivanje vremenskog okvira i vrste školjkaša za uzorkovanje pri mogućem uspostavljanju monitoringa.

8. POPIS LITERATURE

ALSINA, M. and A. R. BLANCH (1994 a): A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Appl. Microbiol. 76, 79-85

ALSINA, M. and A. R. BLANCH (1994 b): Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. J. Appl. Microbiol. 77, 719-721

ANONIMNO (1990): ISO 8914:1990 Microbiology – General guidance for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*

ANONIMNO (2004): UREDBA (EZ) br. 853/2004 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla. SL L 139, 30.04.2004., str. 55.

ANONIMNO (2005): UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenog 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Tekst značajan za EGP). SL L 338, 22.12.2005., str. 1., sa svim izmjenama i dopunama

ANONIMNO (2007): Zakon o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti. Narodne novine, broj 79/2007, 113/2008 i 43/2009

ANONIMNO (2014): Lista zaraznih bolesti čije je sprječavanje i suzbijanje od interesa za Republiku Hrvatsku. Narodne novine, broj 60/2014

ANONIMNO (2016): EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal 2016;14(12):4634, 231 pp. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>

ANONIMNO (2017): HRN EN ISO 21872-1:2017, Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za određivanje *Vibrio* spp. – 1. Dio: Dokazivanje prisutnosti

potencijalno enteropatogenih *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* i *Vibrio vulnificus*,
Hrvatski zavod za norme

ANONIMNO (2018): EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018; 16(12):5500, 262 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>

ANONIMNO (2019): EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal 2019; 17(12):5926, 276 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>

ANONIMNO (2020): Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša. <http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/HranaZaZiv/Plan.pracenja.kakvoce.mora.i.skoljkasa.2020.pdf>

ANONIMNO (2021): Jadransko more. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 18. 8. 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=28478>

ANONIMNO (2021): <https://www.museum.zoo.cam.ac.uk/collections-research/ddf-bivalve-mollusc-project/anatomy-bivalve> 01.04.2021.

ANONIMNO (2021): EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021; 19(2): 6406, 286 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

AUSTIN, B. (2010): Vibrios as causal agents of zoonoses. Vet. Microbiol. 140, 310-317 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.015>

AZANZA, P. V., K. A. BUCKLE, G. H. FLEET (1996): Effect of diluents on enumeration of the *Vibrio vulnificus*. Int. J. Food Microbiol. 30, 385-390
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00948-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00948-8)

BAKER-AUSTIN, C., J. A. TRINANES, N. G. H. TAYLOR, R. HARTNELL, A. SIITONEN, J. MARTINEZ-URTAZA (2012): Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. Nat Clim Chang. Letters
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nclimate1628>

BAKER-AUSTIN, C., J. TRINANES, S. SALMENLINNA, M. LOFDAHL, A. SIITONEN, N. G. H. TAYLOR AND J. MARTINEZ-URTAZA (2016): Heat Wave-Associated Vibriosis, Sweden and Finland, 2014. Emerg. Infect. Dis. 22(7), 1216-1220
<https://dx.doi.org/10.3201%2Feid2207.151996>

BAKER-AUSTIN, C., J. TRINANES, N. GONZALES-ESCALONA, J. MARTINEZ-URTAZA (2017): Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. Trends in Microbiology. 25-1, 76-84
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.008>

BAKER-AUSTIN, C., J. D. OLIVER (2018.): *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. Environ. Microbiol. 20, 423-430
doi:10.1111/1462-2920.13955

BEJ, A. K. , D. P. PATTERSON, C. W. BRASHER, M. C. L. VICKERY, D. D. JONES, C. A. KAYSNER (1999): Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J. Microbiol. Methods. 36, 215-225
[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00037-8)

BILUNG, L. M., S. RADU, A.R. BAHAMAN, R. A. RAHIM, S. NAPIS, M. W. C. V. LING, G. B. TANIL, M. NISHIBUCHI (2005): Detecton of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR. FEMS Microbiol. Lett. 252, 85-88
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.053>

BLACKSTONE G. M., J. L. NORDSTROM, M. C. L. VICKERY, M. D. OWEN, R. F. MEYER, A. DEPAOLA (2003): Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. J. Microbiol. Methods. 53, 149-155

BLANCO-ABAD, V., J. ASEDE-BERMEJO, A. RODRIGUEZ-CASTRO, J. MARTINEZ-URTAZA (2009): Evaluation of different procedures for optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. Int. J. Food Microbiol. 129, 229-236

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.028>

BONNIN-JUSSERAND M, S. COPIN, C. LE BRIS, T. BRAUGE, M. GAY, A. BRISABOIS, T. GRARD and G. MIDELET-BOURDIN (2017): *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological *versus* recent molecular detection methods in seafood products, Crit Rev Food Sci Nutr

DOI: [10.1080/10408398.2017.1384715](https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1384715)

CANIGRAL I., Y. MORENO, J. L. ALONSO, A. G., M. A. FERRUS (2009): Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean costal area. Microbiol. Res. 165, 657-664

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.012>

CAVALLO, R. A., L. STABILI (2002): Vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). Water Res. 36, 3719-3726

[https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00107-0](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00107-0)

CHUN, J., A. HUQ and R. R. COLWELL (1999): Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 65, No. 5, 2202-2208

doi: 10.1128/AEM.65.5.2202-2208.1999.

CLEMENTS, K., R. S. QUILLIAM, D. L. JONES, J. WILSON, S. K. MALHAM (2015): Spatial and temporal heterogeneity of bacteria across an intertidal shellfish bed: Implications for regulatory monitoring of faecal indicator organisms. *Sci. Total Environ.* Vo. 506-507, 1-9
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.100>

COLWELL, R.R. (1996): Global Climate and Infectious Disease: The Cholera Paradigm. *Science, New Series*, Vol. 274, No. 5295, 2025-2031
<https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2025>

CÓRDOVA, J. L., J. ASTORGA, W. SILVA i C. RIQUELME (2002): Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolats collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biol. Res.* V. 35, N. 3-4
<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602002000300017>

COVADONGA, R.A., R. AZNAR, M. JESUS PUJALTE, E. GARAY (1998): A Comparison of Strategies for the Detection and Recovery of *Vibrio vulnificus* from Marine Samples of the Western Mediterranean coast. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 128-134

CVETNIĆ, Ž. (2013): Bakterijske i gljivične zoonoze. Medicinska naklada Zagreb i Hrvatski veterinarski institut. Infekcije vrstama iz roda *Vibrio*, 183-187

ČADEŽ V., E. TESKEREDŽIĆ (2005): Patogeni mikroorganizmi i toksini koje prenose školjkaši iz onečišćenih područja-zoonoze. *Ribarstvo* 63, 135-145

ČANAK, I., K. MARKOV, A. GAVRILOVIĆ, P. BOSANAC, J. JUG-DUJAKOVIĆ, Ž. JAKOPOVIĆ, D. KOSTELAC, J. PLEADIN, J. FRECE (2018): Mikrobiološki i kemijski parametri ribe i školjkaša. *Croat. J. Food Technol. Biot. Nut.* 13, 44-49

DE MAGNY, G. C., P. K. MOZUMDER, C. J. GRIM, N. A. HASAN, M. N. NASER, M. ALAM, B. SACK, A. HUQ, R. R. COLWELL (2011): Population Dynamics of *Vibrio cholerae* and Cholera in the Bangladesh Sundarbans: Role of Zooplankton Diversity. Running Title: Ecology of *Vibrio cholerae* and cholera in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* , AEM Accepts, published online ahead of print on 15 July 2011.
doi:10.1128/AEM.01472-10

DE PAOLA, A., L. H. HOPKINS and R. M. McPHEARSON (1988): Evaluation of Four methods for Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 54, No 2, 617-618

<https://doi.org/10.1128/aem.54.2.617-618.1988>

DI PINTO, A., G. CICCARESE, R. DE CORATO, L. NOVELLO, V. TERIO (2008): Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. Food Control. 19, 1037-1041

DŽAFIĆ, N. (2012): Učinak sustavnog praćenja higijenske ispravnosti dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) na području Istarske županije, Znanstveni magistarski rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

FAKRUDDIN, M., K. M. A. ALAM, R. M. MAZUMDAR, S. ISLAM, M. N. NIPA, A. IQBAL and H. R. BHUIYAN (2011): Anti-bacterial Activity of the Extract of *Terminalia arjuna* Against Multi Antibiotic Resistant *Vibrio cholerae*. J. Sci. Res. 3(1), 129-137

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) (2016): Selection and application of methods for the detection and enumeration of human-pathogenic halophilic *Vibrio* spp. in seafood: Guidance. Microbiological Risk Assessment Series No. 22. 74p

FUENZALIDA, L., L. ARMIJO, B. ZABALA, C. HERNANDEZ, M. L. RIOSECO, C. RIQUELME, R. T. ESPEJO (2007): *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. Int. J. Food Microbiol. 117, 270-275

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.011>

GONZÁLEZ-ESCALONA, N., V. CACHICAS, C. ACEVEDO, M. L. RIOSECO, J. A. VERGARA, F. CABELLO, J. ROMERO and R. T. ESPEJO (2005): *Vibrio parahaemolyticus* Diarrhea, Chile, 1998 and 2004. CDC Emerging Infectious Diseases www.cdc.gov/eid Vol. 11, No. 1, January 2005

DOI: 10.3201/eid1101.040762

HALPERN, M., I. IZHAKI (2017): Fish as host of *Vibrio cholerae*. Frontier in Microbiology, 8, 282.

Doi 10.3389/fmicb.2017.00282

HARA-KUDO, Y., S. SAITO, K. OHTSUKA, S. YAMASAKI, S. YAHIRO, T. NISHIO, Y. IWADA, Y. OTOMO, H. KONUMA, H. TANAKA, H. NAKAGAWA, K. SUGIYAMA, Y. SUGITA-KONISHI, S. KUMAGAI (2012): Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. Int. J. Food Microbiol. 157, 95-101 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.019>

HARRIS, J. B., R. C. LA ROCQUE, F. QADRI, E. T. RYAN, S. B. CALDERWOOD (2012): Cholera. Lancet, 379, 2466-2476

HARWOOD, V. J., J. P. GANDHI, A. C. WRIGHT (2004): Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: A review. J. Microbiol. Methods. 59, 301-316
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.08.001>

HÄSE, C. C., B. BARQUERA (2001): Role of sodium bioenergetics in *Vibrio cholerae*. Biochim. Biophys. Acta. 1505, 169-178
[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00286-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00286-3)

HELM, M.M., N. BOURNE (2004): Hatchery culture of bivalves. Ed. Allesandro Lovatelli. Part 2 Basic bivalve biology: taxonomy, anatomy and life history A practical manual. FAO fisheries technical paper 471, FAO. Rome, Italy, dostupno na <http://www.fao.org/3/y5720e/y5720e07.htm> 01.04.2021.

HILL, W.E., S., P. KEASLER, M. W. TRUCKSESS, P. FENG, C. A. KAYSNER and K. A. LAMPLE (1991): Polymerase Chain Reaction Identification of *Vibrio vulnificus* in Artificially Contaminated Oysters. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 57, No. 3, 707-711
<https://doi.org/10.1128/aem.57.3.707-711.1991>

HUQ, A., E. B. SMALL, P. A. WEST, M. I. HUQ, R. RAHMAN, R. R. COLWELL (1983): Ecological Relationships Between *Vibrio cholerae* and Planktonic Crustacean Copepods. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 45., No.1, 278-283
<https://doi.org/10.1128/aem.45.1.275-283.1983>

HUQ, A., B. J. HALEY, E. TAVIANI, A. CHEN, N. A. HASAN, R. R. COLWELL (2013): Detection, Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* from the Environment. National Institute of Health. Curr Protoc Microbiol. 2012 August; CHAPTER: Unit 6A.5
Doi: 10.1002/9780471729259.mc06a05s26

IGBINOSA, E. O., A. I. OKOH (2008): Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. Institut Pasteur. Res. Microbiol. 159, 495-506
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.07.001>

IVEZIĆ-JAKŠIĆ, S. (1986): Higijensko značenje te postupci izolacije i determinacije *Vibrio parahaemolyticus* iz morske vode, ribe i školjkaša. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

JAKŠIĆ, S., S. UHITIL, T. PETRAK, D. BAŽULIĆ, L. GUMHALTER KAROLY (2002): Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. Food Control 13, 491-493
[https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00027-0).

KANEKO, T., R. R. COLWELL (1973): Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. J. Bacteriol. Res. Vol. 113, No.1, 24-32

KANEKO, T., R. R. COLWELL (1975): Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto Chitin and Copepods. Appl. Microbiol. Vol. 2, No 2, 269-274

KIM, J. B., J. OKUDA, C. MATSUMOTO, N. TAKAHASHI, S. HASHIMOTO and M. NISHIBUCHI (1999): Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene. J. Clin. Microbiol. Vol. 37, Issue 4, 1173-1177
<https://doi.org/10.1128/JCM.37.4.1173-1177.1999>

KITAURA, T. , S. DOKE, I. AZUMA, M. IMAIDO, K. MIYANO, K. HARADA and E. YABUUCHI (1983): Halo production by sulfatase activity of *V. vulnificus* and *V. cholerae* O1 on a new selective sodium dodecyl sulfate-containing agar medium: a screening marker in environmental surveillance. FEMS Microbiol. Lett. 17, 205-209

KONEMAN, E. W., S. D. ALLEN, W. M. JONDA, P. C. SCHRECKENBERGER, W. C. WINN (2000): Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. *Part 2: The Families Vibrionaceae and «Aeromonadaceae»*. Str. 339-348.

KRSTULOVIĆ, N., ŠOLIĆ, M. (1997): Mikrobiološko zagađenje mora. Hrvatska vodoprivreda. VI, (55), 31-35

KURAL, A.G., C. HAIQIANG (2008): Conditions for a 5-log reduction of *Vibrio vulnificus* in oysters through high hydrostatic pressure treatment. Int. J. Food Microbiol. 122, 180-187
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.074>

KURAL, A.G., A. E. H. SHEARER, D. H. KINGSLEY, H. CHEN (2008): Conditions for high pressure inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. Int. J. Food Microbiol. 127, 1-5
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.003>

KUREČIĆ FILIPOVIĆ, S. (2017): Izvješće o zaraznim bolestima u Hrvatskoj za 2017. godinu
https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/11/ZBVHR_2017_Final.pdf

KVRGIĆ, K., N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2021): Fikotoksini u morskim organizmima – potencijalna prijetnja sigurnosti potrošača. Vet. Stanica.
<https://doi.org/10.46419/vs.52.6.13>

LARSEN, A. M., F. S. RIKARD, W. C. WALTON, C. R. ARIAS (2013): Effective reduction of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) using high salinity depuration. Food Microbiol. 34, 118-122
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.009>

LEE, C.-Y., S.-F. PAN, C.-H. CHEN (1995): Sequence of a Cloned pR72H fragment and Its Use For Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish with the PCR. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 61(4), 1311-1317
doi: 10.1128/aem.61.4.1311-1317.1995.

LEE, R. J., A. D. YOUNGER (2002): Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. Int. Biodeterior. 50, 177-183
[http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00084-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00084-7)

LEE, J.-K., D.-W. JUNG, S.-Y. EOM, S.-W. OH, Y. KIM, H.-S. KWAK, Y.-H. KIM (2008): Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. Food Control. 19, 990-994
<http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.foodcont.2007.10.006>

LEE, C.-Y., G. PANICKER, A. K. BEJ (2003): Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization. J. Microbiol. Methods. 53, 199-209
doi:10.1016/S0167-7012(03)00032-0

LEES, D., (2000): Viruses and bivalve shellfish. Int. J. Food Microbiol. 59, 81-116
[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00248-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00248-8)

LEI, M., Y.-C. SU (2011): Validation of high pressure processing for inactivating *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crossostrea gigas*). Int. J. Food Microbiol. 144, 469-474
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.037

LE ROUX F., WEGNER K.M., BAKER-AUSTIN C., VEZZULLI L., OSORIO C.R., AMARO C., RITCHIE J.M., DEFOIRDT T., DESTOUMIEUX-GARZÓN D., BLOKESCH M., MAZEL D., JACQ A., CAVA F., GRAM L., WENDLING C.C., STRAUCH E., KIRSCHNER A. AND HUEHN S. (2015): The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). Front. Microbiol. 6:830.
doi: 10.3389/fmicb.2015.00830

LETCHUMANAN, V., C. KOK-GAN, L. LEARN-HAN (2014): *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. Front. Microbiol. 5, 705.

doi:10.3389/fmicd.2014.00705

LHAFI, S. K., M. KÜHNE (2007): Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. Int. J. Food Microbiol. 116, 297-300

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.007

LIEW, W. S., J. J. LEISNER, G. RUSUL, S. RADU, A. RASSIP (1998): Survival of *Vibrio* spp. including *V. cholerae* O139 during heat-treatment of cockles (*Anadara granosa*). Int. J. Food Microbiol. 42, 167-173

[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00085-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00085-3)

LINKOUS, D.A., J. D. OLIVER (1999): Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol. Lett 174, 207-214

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13570.x>

LIPP, E. K., A. HUG, R. R. COLWELL (2002): Effects of global climate on infectious disease: The Cholera model. Clin. Microbiol. Rev. 15, 757-770

<https://dx.doi.org/10.1128%2FCMR.15.4.757-770.2002>

LOPEZ-JOVEN, C., I. RUIZ-ZARZUELA, I. DE BLAS, M.D. FURONESA, A. ROQUE (2011): Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperatures. Food Microbiol. 28, 951-956

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.007>

LOTZ, M. J., M. L. TAMPLIN and G. E. RODRICK (1983.): Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar and Its Selectivity for Clinical and Marine *Vibrio* Organisms. Ann. Clin. Lab. Sci. Vol 13, No. 1, 45-48

LOZANO-LEON, A., J. TORRES, C. R. OSORIO, J. MARTINEZ-URTAZA (2003): Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. FEMS Microbiol. Lett. 226, 281-284
[https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00604-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00604-9)

MAHMOUD, S.M.B. (2009): Reduction of *Vibrio vulnificus* in pure culture, half shell and whole shell oyster (*Crassostrea virginica*) by X-ray. Int. J. Food Microbiol. 130, 135-139
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.023>

MARINO, A., L. LOMBARDO, C. FIORENTINO, B. ORLANDELLA, L. MONTICELLI, A. NOSTRO, V. ALONZO (2005): Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* Non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Int. J. Food Microbiol. 99, 281-286
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.09.003>

MASSAD, G. and J. D. OLIVER (1987): New Selective and Differential Medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. [published correction appears in Appl Environ Microbiol 1988 Jan;54(1):280]. Appl. Environ. Microbiol. 53(9):2262-2264.
doi:10.1128/aem.53.9.2262-2264.1987

MAUGERI, T. L., M. CARBONE, M. T. FERA, C. GUGLIANDOLO (2006): Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and plankton of a coastal zone of the Mediterranean Sea. Res. Microbiol. 157, 194-200
<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.06.007>

MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. (1999): Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5, 607-625
<http://dx.doi.org/10.3201/eid0505.990502>

MEUJO, D. A. F., D. A. KEVIN, J. PENG, J. J. BOWLING, J. LIU, M. T. HAMANN (2010): Reducing oyster-associated bacteria levels using supercritical fluid CO₂ as an agent of warm pasteurization. Int. J. Food Microbiol. 138, 63-70
<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.ijfoodmicro.2009.11.012>

MIKUŠ, T., S. UHITIL, A. BENUSSI SKUKAN, B. NJARI, L. KOZAČINSKI (2010): Rizici infekcije s *V. parahaemolyticus* u hrani morskog podrijetla. Meso, 5, 294-298.

MONTANARI, M. P., C. PRUZZO, L. PANE, R. R. COLWELL (1999): Vibrios associated with plankton in coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). FEMS Microbiol. Ecol. 29, 241-247
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00615.x>

MUNDAY, R., J. REEVE (2013): Risk Assessment of Shellfish Toxins. Toxins (Basel), 5, 2109-2137
<https://dx.doi.org/10.3390/toxins5112109>

MURCHIE, L. W., M. CRUZ-ROMERO, J. P. KERRY, M. LINTON, M. F. PATTERSON, M. SMIDDY, A. L. KELLY (2005): High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. Innov Food Sci Emerg Technol. 6, 257-270

NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija. Specijalna bakteriologija i mikologija. Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Hrvatsko mikrobiološko društvo. Rod *Vibrio*, 47

NALIN, D. R., V. DAYA, A. REID, M. M. LEVINE, AND L. CISNEROS (1979): Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. Infect. Immun. 25:768- 770

NELAPATI, S., K. NELAPATI, B. K. CHINNAM (2012): *Vibrio parahaemolyticus*- An emerging foodborne pathogene – A Review. Vet. World. Vol. 5(1), 48-62

NISHIBUCHI, M. And J. B. KAPER (1985): Nucleotide Sequence of the Thermostable Direct Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. Res. 162(2), 558-564
<https://doi.org/10.1128/jb.162.2.558-564.1985>

NORMANNO, G., A. PARISI, N. ADDANTE, N. C. QUAGLIA, A. DAMBROSIO, C. MONTAGNA, D. CHIOCCO (2006): *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia regio (Italy). Int. J. Food Microbiol. 106, 219-222

OKUDA, J., M. ISHIBASHI, E. HAYAKAWA, T. NISHINO, Y. TAKEDA, A. K. MUKHOPADHYAY, S. GARG, S. K. BHATTACHARYA, G. B. NAIR and M. NISHIBUCHI (1997): Emergence of a Unique O3:K6 Clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and Isolation of Strains from the Same Clonal Group from Southeast Asian Travelers Arriving in Japan. J. Clin. Microbiol. Vol. 35. No.12, 3150-3155
<https://doi.org/10.1128/jcm.35.12.3150-3155.1997>

OLIVEIRA, J., A. CUNHA, F. CASTILHO, J. L. ROMALDE, M. J. PEREIRA (2011): Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives- A mini review. Food Control. 22, 805-816
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.032>

OTTAVIANI D., S. SANTARELLI, S. BACCHIOCCHI, L. MASINI, C. GHITTINO, I. BACCHIOCCHI (2005): Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy. Food Microbiol. 22, 585-590

PENDRU R., I. KARUNASAGAR, I. KARUNASAGAR (2009): Improved isolation and detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using a new enrichment broth. Int. J. Food Microbiol. 129, 200-203
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.026>

PHUVASATE S., M.-H. CHEN, Y.-C.SU (2012): Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by depuration at various temperatures. Food Microbiol. 31, 51-56
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.004>

PHUVASATE S., Y.-C. SU (2015): Efficacy of low-temperature high hydrostatic pressure processing in inactivating *Vibrio parahaemolyticus* in culture suspension and oyster homogenate. Int. J. Food Microbiol. 196, 11-15
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.018>

RAGHUNATH, P., S. ACHARYA, A. BHANUMATHI, I. KARUNASAGAR, I. KARUNASAGAR (2008): Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. Food Microbiol. 25, 824-830

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.002>

RAGHUNATH, P., I. KARUNASAGAR, I. KARUNASAGAR (2009): Improved isolation and detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using a new enrichment broth. Int. J. Food Microbiol. 129, 200-203

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.026>

RIBARIĆ, B, L. KOZAČINSKI, B. NJARI, Ž. CVRTILA (2012): Toksini školjkaša. Meso, 14, 145-151.

RIPABELLI, G., M. L. SAMMARCO, G. M. GRASSO, I. FANELLI, A. CAPRIOLI, I. LUZZI (1999): Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. Int. J. Food Microbiol. 49, 43-48

[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00056-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00056-2)

RIVERA, I., N., J. CHUN, A. HUQ, B. B. SACK and R. R. COLWELL (2001): Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol., June 2001. 2421-2429

DOI: 10.1128/AEM.67.6.2421-2429.2001

ROBERT-PILLOT, A., A. GUENOLE, J.-M. FOURNIER (2002): Usfulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. FEMS Microbiol. Lett. 215, 1-6

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11362.x>

RONHOLM, J., F. LAU and S. K. BANERJEE (2016): Emerging Seafood Preservation Techniques to Extend Freshness and Minimize *Vibrio* contamination. Front. Microbiol. 7:350
doi: 10.3389/fmicb.2016.00350

ROSEC, J.-P., M. SIMON, V. CAUSSE, M. BOUDJEMAA (2009): Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: Comparison of PCR protocols using pR72H or *toxR* targets with a culture method, Int. J. Food Microbiol. 129, 136-145
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.017>

ROSEC, J.-P., V. CAUSSE, B. CRUZ, J. RAUZIER., L. CARNAT (2012): The international standard ISO/TS 21872-1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood: Its improvement by use of a chromogenic medium and PCR. Int. J. Food Microbiol. 157, 189-194
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.026>

RUKAVINA, T. (2013): Vibrioni i srodne bakterije. Vibrio. U: Kalenić, S. i sur. Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb. Str. 201-205

SU, Y.-C., C. LIU (2007): Review *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiol. 24, 549-558
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.005>

SUFFREDINI, E., R. MIONI, R. MAZZETTE, P. BORDIN, P. SERRATORE, F. FOIS, A. PIANO, L. COZZI, L. CROCI (2014): Detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from Italian production areas. Int. J. Food Microbiol. 184, 14-20
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.016>

SUREERAT P., M. CHEN, Y.-C. SU (2012): Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by depuration at various temperatures. Food Microbiol. 31, 51-56
doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.004

SUZITA, R., A. S. ABDULAMIR, F. ABU BAKAR, R. SON (2009): A. Mini Review: Cholera Outbreak via Shellfish. Am. J. Infect. 5(1), 40-47

ŠKOKO, I. (2015): Dokazivanje i filogenetska analiza norovirusa izdvojenih iz školjkaša s proizvodnih područja u Republici Hrvatskoj, Doktorski rad.

VERNOCCI, P., M. MAFFEI, R. LANCIOTTI, G. SUZZI, F. GARDINI (2007): Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). Food Control. 18, 1575-1583

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.12.009>

WANG, D., D. ZHANG, W. CHEN, S. YU, X. SHI (2010): Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment. Int. J. Food Microbiol. 137, 76-80

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.022>

WANG, S., R. E. LEVIN (2007): Thermal factors influencing detection of *Vibrio vulnificus* using real-time PCR. J. Microbiol. Methods. 69, 358-363

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.003>

WITTMAN R. J., G. J., FLICK (1995): Microbial contamination of shellfish: Prevalence, risk to human health, and control strategies. Annu. Rev. Public Health 16, 123-140

<https://doi.org/10.1146/annurev.pu.16.050195.001011>

WU, Y., J. WEN, Y. MA, X. MA, Y. CHEN (2014): Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003-2008. Food Control. 46, 197-2002

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.023>

XI, D., C. LIU, Y-C. SU, (2012): Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats. Food Control. 25, 368-373

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.002>

YE, M., Y. HUANG, J. B. GURTNER, B. A. NEIMIRA, J. E. SITES, H. CHEN (2013): Effects of pre- or post-processing storage conditions on high-hydrostatic pressure inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in oysters. Int. J. Food Microbiol. Volume 163, Issues 2-3, 146-152

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.019>

YU, W.-T., K.-J. JONG, Y.-R. LIN, S.-E. TSAI, Y. H. TEY, H.-C. WONG (2013):
Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan.
Int. J. Food Microbiol. 160, 185-192
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.002>.

ZHAO, F., D. ZHOU, H. CAO, L. MA, Y. JING (2011): Distribution, serological and
molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish in the eastern coast of
China. Food Control. 22, 1095-1100
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.017>

9. ŽIVOTOPIS

Natalija Džafić rođena je 13. listopada 1973. u Rijeci, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Studij veterinarske medicine pri Veterinarskom fakultetu u Zagrebu završila je 2000. godine. U Veterinarskoj stanici Rijeka radila je kao pripravnik - vježbenik, većinom na inspekcijskim poslovima.

U Hrvatskom veterinarskom institutu, Veterinarskom zavodu Rijeka radi od 2001. na radnom mjestu stručnog suradnika u mikrobiološkom laboratoriju.

Godine 2001. upisala je poslijediplomski studij pri Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, smjer higijena i tehnologija namirnica. Magistarsku znanstvenu raspravu pod nazivom "Učinak sustavnog praćenja higijenske ispravnosti dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) na području Istarske županije" obranila je 2012.

Aktivno je sudjelovala u pripremama i realizaciji akreditacije laboratorija Veterinarskog zavoda Rijeka, te pohađala sve edukacije organizirane od strane HVI-a, prvenstveno o upravljanju kvalitetom. Tijekom 2006. prisustvuje stručnim radionicama u Italiji (Teramo, IZS - mikrobiologija hrane), Velikoj Britaniji (Weymouth, CEFAS - mikrobiologija školjkaša), potom 2007. Irska (Galway, mikrobiologija školjkaša), 2010. Nizozemska (Wageningen - biotoksini školjkaša), 2011. Turska (Ancara - mikrobiologija i biotoksini školjkaša), 2014. Italija (Teramo, IZS - mikrobiološki i molekularni postupci dokazivanja *Vibrio* spp. u školjkašima) CAPS 2 projekt), 2014. HVI Zagreb - molekularna dijagnostika - PCR.

Od 2007. do 2012. godine je voditeljica Laboratorija za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje.

Od 01. siječnja 2009. do danas je na radnom mjestu predstojnice Veterinarskog zavoda Rijeka.

Od 2010. do 2012. godine vodi projekt adaptacije i rekonstrukcije zgrade Veterinarskog zavoda Rijeka, u sklopu programa CAACP/CW/NCB/2-4- Projekt pravnog i institucionalnog usklađivanja na području poljoprivrede s pravnom stečevinom EU.

Sudjeluje na projektima CAPS2 (Strengthening of Centres for Aquaculture production and safety surveillance in Adriatic Cross-border Countries) 2013. - 2016.; AdriaAquaNet (Interreg V-A Italy-Croatia CBC Programme 2014 - 2020) 2019. - 2021.; SPRINT (EU OBZOR2020: Sustainable plant protection transition: a global health approach) 2020. - 2021.

Engleski jezik aktivno govori.

Udana je i majka dvoje djece (Sara 2003., i Jan 2007.).

Popis objavljenih radova:

Znanstveni i pregledni radovi:

DŽAFIĆ N., K. KVRGIĆ, L. KOZAČINSKI, A. HUMSKI (2021): Halofilni vibriji u školjkašima kao potencijalno patogeni uzročnici zoonoza u ljudi. Vet. Stanica. 52, 6; 725-736
doi.org/10.46419/vs.52.6.12

KVRGIĆ K., N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2021): Fikotoksini u morskim organizmima - potencijalna prijetnja sigurnosti potrošača. Vet. Stanica. 52, 6; 739-749
doi:10.46419/vs.52.6.13

KVRGIĆ K., T. LEŠIĆ, A. A. IBRAHIM, N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2021): Cyclic imines in shellfish and ascidians in the northern Adriatic Sea. Food Addit Contam Part B-Surveillance, 14 1; 12-22

KREŠIĆ G., J. PLEADIN, K. KVRGIĆ, L. LEŠIĆ, N. DŽAFIĆ, S. ZRNČIĆ, A. VULIĆ, T. BOGDANOVIĆ, D. ORAIĆ, N. VAHČIĆ (2020): Seasonal and geographical variations of chemical composition and fatty acid profile of Mediterranean mussels. Food Nutr. Res. 59, 2; 163-173

PLEADIN J., K. KVRGIĆ, S. ZRNČIĆ, T. LEŠIĆ, O. KOPRIVNJAK, A. VULIĆ, N. DŽAFIĆ, D. ORAIĆ, G. KREŠIĆ (2019): Variations in nutritive composition of three shellfish species. Ital J Food Sci, 31, 4; 716-730. <https://www.bib.irb.hr/1036582>

BILANDŽIĆ N., M. SEDAK, B. ČALOPEK., S. ZRNČIĆ, D. ORAIĆ, M. BENIĆ, N. DŽAFIĆ, D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, T. BOGDANOVIĆ, S. PETRIČEVIĆ, I. UJEVIĆ (2016): Element differences and evaluation of the dietary intake from farmed oysters and mussels collected at different sites along the Croatian coast of the Adriatic Sea. J Food Compost Anal., 45, 39-49
doi:10.1016/j.jfca.2015.09.012

PETROVIĆ M., G. KREŠIĆ, S. ZRNČIĆ, D. ORAIĆ, N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2015): Influence of season and farming location on the quality parameters of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). Ital J Food Sci, 27, 2; 151-159
doi:10.14674/1120-1770%2Fijfs.v181

BILANDŽIĆ N., M. SEDAK, B. ČALOPEK, N. DŽAFIĆ, D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, D. POTOČNJAK (2015): Metal content in four shellfish species from the Istrian coast of Croatia. Bull Environ Contam Toxicol., 95 (2015), 611-617
doi:10.1007/s00128-015-1619-0

Drugi radovi u časopisima

DŽAFIĆ N., T. FUMIĆ, B. NJARI (2012): Uzgoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) kao sigurne hrane. Meso: prvi hrvatski časopis o mesu, 14 (2012), 4; 322-327

Radovi u zbornicima skupova

Stručni radovi u zbornicima skupova

KVRGIĆ K., D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2019): Procjena kvalitete meda u ugostiteljskim objektima Primorsko-goranske i Istarske županije ispitivanjem udjela hidroksimetilfurfurala. Zbornik radova s 11. međunarodnog znanstveno-stručnog skupa Hranom do zdravlja / Jerković, I. ; Šubarić, D. ; Jašić, M. (ur.). Split i Osijek, str. 137-145

KVRGIĆ K., J. ČAKARUN MILETIĆ, N. DŽAFIĆ, D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, J. PLEADIN (2018): Biotoksini u dagnjama i kamenicama izlovljenim u području istočne i zapadne obale Istre. Zbornik radova 10th International Scientific and Professional Conference "With Food to Health" Osijek, 2018. str. 146-153

Drugi radovi u zbornicima skupova

ZRNČIĆ S., J. PLEADIN, D. ORAIĆ, N. DŽAFIĆ, Ž. PAVLINEC, I. G. ZUPIČIĆ (2021): Projekt "AdriAquaNet - jačanje inovacija i održivosti u jadranskoj akvakulturi". Veterinarski dani 2021 / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, 2021. str. 299-306

Sažeci sa skupova

Sažeci u zbornicima i časopisima

KVRGIĆ K., T. LEŠIĆ, N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2021): Differential accumulation of domoic acid in European oysters, Queen scallops and ascidians *Microcosmus* spp.. Book of Abstracts of the 13th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH / Babić, Jurislav ; Šubarić, Drago ; Jašić, Midhat (ur.). Osijek. str. 101-101

KVRGIĆ K., D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2019): Occurrence and profile of PSP toxins in ascidians *Microcosmus* spp. harvested in western waters of Istrian peninsula. ICFC2019 Book of Abstracts. Lisabon. str. 100-100

HUMSKI A., M. MIKULIĆ, D. STOJEVIĆ, L. JURINOVIĆ, N. DŽAFIĆ, D. VUČKOVIĆ (2019): Quantitative data on *Campylobacter* spp. in broiler neck skins in different regions of Croatia. 20th International workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms - Belfast, Northern Ireland, UK. Belfast, str. 231-231

KVRGIĆ K., D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2019): Pojavnost cikličkih imina u kamenicama (*Ostrea edulis*) podrijetlom iz sjevernog Jadrana. Zbornik radova, Veterinarski dani 2019. Primošten, Hrvatska, str. 161-162

KVRGIĆ K., D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2019): Pojavnost cikličkih imina u dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*) podrijetlom iz sjevernog Jadrana. Book of Abstracts of the 12th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH / Babić, J. ; Šubarić, D. ; Jašić, M. (ur.). Osijek, str. 99-99

KVRGIĆ K., D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, N. DŽAFIĆ, J. PLEADIN (2018): Procjena kvalitete meda u ugostiteljskim objektima Primorsko-goranske i Istarske županije ispitivanjem udjela hidroksimetilfurfurala. Knjiga sažetaka s 11. međunarodnog znanstveno-stručnog skupa Hranom do zdravlja / Jerković, I. ; Šubarić, D. ; Jašić, M. (ur.). Split, Osijek i Tuzla, str. 109-109

PLEADIN J., K. KVRGIĆ, N. VAHČIĆ, S. ZRNČIĆ, A. VULIĆ, T. LEŠIĆ, N. DŽAFIĆ, D. ORAIĆ, G. KREŠIĆ (2018): Impact of locality on fatty acids composition of the mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Book of Abstracts International conference 17th Ružička days "Today science - tomorrow industry" / Tomas, S ; Ačkar, Đ. (ur.). Osijek, str. 89-89

PLEADIN J., K. KVRGIĆ, S. ZRNČIĆ, T. LEŠIĆ, A. VULIĆ, N. DŽAFIĆ, D. ORAIĆ, G. KREŠIĆ (2018): Variations in fatty acid composition of the European flat oyster (*Ostrea edulis*) from the Adriatic Sea. Book of Abstracts 9th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists / Kovačević Ganić, Karin (ur.). Zagreb: Croatian Society of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, str. 167-167

KVRGIĆ K., J. ČAKARUN MILETIĆ, N. DŽAFIĆ, D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, J. PLEADIN (2017): Pojavnost biotoksina u dagnjama i kamenicama izlovljenim u području istočne i zapadne obale Istre. Knjiga sažetaka s 10. međunarodnog znanstveno-stručnog skupa "Hranom do zdravlja" / Šubarić, Drago ; Jašić, Midhat (ur.). Osijek, 2017. str. 91-91

BILANDŽIĆ N., M. SEDAK, B. ČALOPEK, S. ZRNČIĆ, D. ORAIĆ, N. DŽAFIĆ, D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ, T. BOGDANOVIĆ, S. PETRIČEVIĆ, I. UJEVIĆ (2015): Cadmium levels and evaluation of the dietary intake of mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*) from southern and northern farming areas along the Croatian coast of the Adriatic Sea. ICS 2015 Congress Proceedings of International Cadmium Symposium 2015 Sassari: University of SASSARI Department of Biomedical Sciences, Italy, str. 70-70

Druga sudjelovanja na skupovima

HUMSKI A., N. DŽAFIĆ (2012): CVI, NRL for *Listeria monocytogenes*. 6th Workshop of NRLs for *Listeria monocytogenes*, Pariz, Francuska.

Prošireni sažeci u zbornicima i časopisima

DŽAFIĆ N., B. BOLJKOVAC, K. KVRGIĆ, D. MIŠETIĆ OSTOJIĆ (2019): Određivanje roka trajnosti brancina i orade pakiranih u modificiranoj atmosferi. Veterinarski dani / Harapin, Ivica (ur.). Primošten, 2019. str. 159-160

Ocjenski radovi

Magistarski radovi

DŽAFIĆ, N. (2012): Učinak sustavnog praćenja higijenske ispravnosti dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) na području Istarske županije. Magistarski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu