

**Valutazione della protezione indotta da frazioni antigeniche
di *Lactococcus garvieae* in trota iridea
(*Oncorhynchus mykiss*)**

*Assessment of the protection induced by antigenic fractions
of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout
(*Oncorhynchus mykiss*)*

**Donatella Volpatti*, Barbara Contessi, Erica Buonasera,
Laura Gusmani, Marco Bertoia, Marco Galeotti**

Sezione di Biologia e Patologia Animale, Dipartimento di Scienze Animali,
Università degli Studi di Udine, Via delle Scienze, 206 – 33100 Udine

RIASSUNTO – La profilassi vaccinale contro la Lattococcosi della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) è ancora in fase sperimentale e contempla l'utilizzo di vaccini stabulogeni somministrati per via intraperitoneale, anche se la copertura che ne deriva raggiunge al massimo 8 mesi, nel caso di vaccini integrati con adiuvanti. I componenti antigenici coinvolti nella protezione dall'infezione sono ancora poco studiati. Questa indagine si è posta come obiettivo quello di approfondire le conoscenze sulle componenti antigeniche del patogeno in grado di suscitare una risposta immunitaria protettiva nei confronti della malattia. Prodotti batterici extracellulari (ECPs), cellule batteriche (WCs) e antigeni di membrana (AM) sono stati somministrati per via intraperitoneale a soggetti di trota iridea di peso medio pari a 90 g. Per valutare la protezione, i soggetti immunizzati sono stati sottoposti ad infezione sperimentale con *Lactococcus garvieae*, inoculando intraperitoneo $2,6 \times 10^5$ UFC/soggetto. I trattamenti hanno garantito le seguenti percentuali relative di sopravvivenza (RPS): 95% per WCs, 35% per ECPs, 33% per AM. Questi risultati confermano che le cellule intere inattivate con formalina conferiscono la maggiore protezione tra gli antigeni impiegati. Anche le frazioni ECPs ed AM risultano efficaci in tal senso, seppure con RPS più basse. Dai gruppi immunizzati, inoltre, sono stati prelevati campioni di siero ed è stato eseguito l'immunoblotting, dopo corsa elettroforetica dei diversi antigeni, per evidenziare le bande proteiche riconosciute dagli anticorpi contenuti nel siero. Le bande evidenziate sono quelle a peso molecolare approssimativo di 23, 48 e 102 kDa. Il riconoscimento è avvenuto anche nel caso dei sieri ottenuti dal gruppo non trattato e ciò suggerisce che le immunoglobuline di trota possono legare in modo aspecifico alcune componenti proteiche presenti nella parete di *L. garvieae*.

*SUMMARY – Effective procedures of vaccination against lactococcosis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) are still under investigation and the methods currently employed are based on “autovaccines” that are injected intraperitoneally to fish. These vaccines allow a protection for 8 months, when integrated with adjuvants. The bacterial antigenic components involved in the protection are only partially considered by the literature. This investigation concerns the effect of some fractions of *Lactococcus garvieae* in the development of a protective immune response to the infection. Extracellular products (ECPs), bacterial whole cells (WCs) and membrane antigens (AM) were injected intraperitoneum to 90 g. rainbow trouts. Fish were subsequently submitted to an intraperitoneal challenge with *L. garvieae* (2.6×10^5 cfu/individual). The treatments allowed the following relative percentages of survival (RPS): 95% for WCs; 35% for ECPs, 33% for AM. These results suggest that WCs give the best protection, but also ECPs and AM are effective. Samples of serum collected from immunized and control fish were analysed by immunoblotting against the SDS-PAGE/Western Blotting protein profile of each bacterial fraction. The control and immunized fish sera contained immunoglobulins able to bind aspecifically the proteins having a molecular weight of 23, 48 and 102 kDa respectively.*

Key words: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fish lactococcosis, *Lactococcus garvieae*, Antigen fractions, Immunization, Immune response.

* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Scienze Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via delle Scienze, 206 - 33100 Udine, Italy. Tel.: 0432-558591; Fax: 0432-558585; E-mail: donatella.volpatti@uniud.it.

INTRODUZIONE

La lattococcosi o streptococcosi causata da *Lactococcus garvieae* è una delle più importanti malattie che coinvolgono gli allevamenti ittici di tipo intensivo, provocando ingenti perdite economiche specialmente nel caso della ricciola (*Seriola quinqueradiata*) in Giappone e della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Europa ed Australia (Kusuda *et al.*, 1991; Domenech *et al.*, 1993; Eldar *et al.*, 1996; Bercovier *et al.*, 1997; Eldar & Ghittino, 1999; Ravelo *et al.*, 2001).

I trattamenti terapeutici utilizzati in campo contro questo batterio sono generalmente poco efficaci, probabilmente per la tendenza alla condizione di anoressia che è tipica dei pesci malati e per l'acquisizione di antibiotico-resistenza da parte dei ceppi batterici (Austin & Van Pouce, 1993). Per tali motivi lo sviluppo di efficaci sistemi di vaccinazione sembra determinante per prevenire gli episodi di lattococcosi.

Per quanto riguarda i paesi extraeuropei, in Giappone e Corea recentemente sono stati prodotti e commercializzati vaccini orali e iniettabili contro *Lactococcus garvieae* per la prevenzione della malattia in *Seriola quinqueradiata* (Ooyama *et al.*, 2002) e in *Paralichthys olivaceus* (Jung, comunicazioni personali). I vaccini utilizzati in Europa per la lattococcosi sono di tipo stabulogeno e quindi ricavati direttamente da ceppi patogeni di *L. garvieae* isolati nell'allevamento in cui verrà effettuata la vaccinazione. Attualmente in Italia risultano autorizzati vaccini stabulogeni prodotti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta e quello delle Venezie e tali preparati vengono somministrati con esito positivo presso varie trotecolture del nord Italia (Manfrin *et al.*, 2006).

Dal punto di vista sperimentale, sono stati condotti vari studi sull'efficacia di vaccini o potenziali componenti immunogeni ottenuti da *L. garvieae*. In Europa la specie oggetto di indagine è stata la trota iridea data l'incidenza della malattia in questo territorio. I principali metodi di somministrazione adottati in queste prove sono stati l'iniezione intraperitoneale e l'orale.

Per quanto riguarda la somministrazione intraperitoneale (i.p.), un'indagine è stata condotta da Ceschia *et al.* nel 1997. Questi autori, nel periodo primaverile, hanno vaccinato trote iridee di due diverse taglie (1,3 kg e 6,7 kg rispettivamente) con un vaccino stabulogeno costituito da cellule batteriche inattivate con formalina. La protezione conferita dal vaccino è stata valutata in allevamento mediante l'esposizione dei soggetti a episodi spontanei di malattia nel corso della stagione estiva. La mortalità è stata pari a 17,6% nei soggetti di taglia pari a 1,3 kg, 16,8% nei soggetti di taglia pari a 6,7 kg e 40,4% nei controlli non vaccinati, suggerendo un'efficacia protettiva di questa formulazione nei confronti della malattia.

Bercovier *et al.* nel 1997 hanno riassunto i risultati ottenuti nel corso di vaccinazioni tramite iniezione i.p. in trote iridee di 100-150 g. Il vaccino anti *L. garvieae* risultava protettivo a partire da 3 settimane dopo il trattamento e garantiva una protezione fino ad un massimo di tre mesi.

L'effetto della somministrazione i.p. è stato valutato anche da Ghittino *et al.* (1995). Trote iridee di taglia pari a 150 g. sono state vaccinate con bacterin in presenza o assenza di adiuvante, quindi la protezione in campo è stata valutata esponendo i soggetti alla malattia spontanea. La malattia si è manifestata dopo tre mesi nel secondo gruppo (vaccino senza adiuvante) e dopo 5-6 mesi nel primo gruppo (vaccino con adiuvante).

Vaccini adiuvantati con diverse sostanze sono stati saggati mediante somministrazione i.p. anche in trote iridee di 7 g. La protezione dall'infezione sperimentale è stata valutata a partire da 4 settimane dopo l'immunizzazione, fino ad un massimo di 8 mesi. Gli adiuvanti risultati più efficaci in tal senso, sono Aqua-mun o Montanide-ISA-763-A (oli non minerali)

e in particolare il primo ha garantito una copertura dall'infezione fino a 8 mesi (Ravelo *et al.*, 2006).

Palacios *et al.* (1993) hanno confrontato l'efficacia di un vaccino per *L. garvieae* utilizzando due vie di somministrazione, quella intraperitoneale e quella per immersione, in soggetti di peso medio pari a 100 g. L'infezione sperimentale ha dimostrato che la vaccinazione eseguita tramite iniezione è più efficace di quella per immersione (12,98-29,33% di mortalità contro il 64,55-66,66%). Diversamente Domenech *et al.* (1999) hanno dimostrato l'efficacia di un vaccino per immersione, abbinato a un trattamento immunostimolante, nel corso di una prova di campo che ha previsto la vaccinazione di trote di 30 g. La copertura dalla malattia spontanea è risultata pari a 4 mesi.

Sulla base di queste esperienze, l'unica procedura di somministrazione del vaccino che ha dato risultati confortanti, è stata quella intraperitoneale, che conferisce un buon grado di protezione nei confronti dell'infezione naturale (Bercovier *et al.*, 1997) e sperimentale.

La possibile somministrazione di vaccini orali per la lattococcosi è oggetto di indagini più recenti. In una ricerca effettuata da un gruppo spagnolo è stato valutato, in trote iridee di 22 g., l'effetto combinato di una prima immunizzazione con bacterin somministrato i.p., seguita dopo tre mesi da una immunizzazione orale (per 7 giorni) con lo stesso vaccino sottoposto a diversi sistemi di incapsulazione (Romalde *et al.*, 2004). La protezione conferita da questo protocollo vaccinale è stata valutata infettando sperimentalmente i soggetti tramite iniezione intraperitoneale 4 settimane dopo il richiamo. Il trattamento di richiamo orale ha consentito un incremento della percentuale relativa di sopravvivenza (RPS) dal 40 all'87,5%.

Altra indagini, condotte da Gusmani *et al.* (2004), hanno riguardato la risposta immunitaria evocata dalla somministrazione di formulazioni orali microincapsulate a trote iridee del peso medio di 100 g. I risultati delle valutazioni immunologiche hanno dimostrato che, nel caso dell'intubazione orale, il titolo di anticorpi specifici nel siero e nel muco intestinale dei soggetti vaccinati non subisce variazioni significative, mentre nel caso della somministrazione integrata al mangime alcuni soggetti presentano un lieve incremento degli anticorpi specifici nel siero.

Nell'ambito di una ricerca che ha lo scopo di contribuire alla profilassi della lattococcosi nella trota iridea, in corso presso il Dipartimento di Scienze Animali dell'Università degli Studi di Udine, è sembrato interessante giungere alla purificazione di alcuni componenti strutturali di *L. garvieae* o di suoi prodotti extracellulari, da integrare nella formula di un vaccino. In particolare le frazioni purificate erano le seguenti: prodotti batterici extracellulari (ECPs); cellule batteriche intere inattivate (WCs); antigeni di membrana (AM); proteine M-like.

Lo scopo della presente indagine è stato quello di utilizzare tre di questi antigeni (WCs, ECPs, AM) per immunizzare sperimentalmente, tramite iniezione intraperitoneale, soggetti di trota iridea di taglia suscettibile alla malattia, studiando successivamente alcuni aspetti della risposta immunitaria, nonché la protezione conferita nei confronti di un modello di infezione sperimentale. I parametri che sono stati presi in considerazione a tal fine sono stati la risposta anticorpale specifica, stimata utilizzando tecniche di siero agglutinazione, E.L.I.S.A. ed immunoblotting. L'efficacia di ogni antigene, quale potenziale vaccino, è stata successivamente saggiata *in vivo*, stabilendo la percentuale relativa di sopravvivenza (RPS) in seguito ad infezione con un ceppo virulento di *L. garvieae*, realizzata sfruttando la stessa via di somministrazione dell'antigene. Qualora una delle sostanze purificate dimostrasse particolare potere immunogeno nel corso delle prove effettuate, sia *in vitro* che *in vivo*, potrà essere presa in considerazione per la formulazione di vaccini efficaci nella prevenzione della lattococcosi.

MATERIALI E METODI

Soggetti sperimentali e condizioni di allevamento

Trote iridee di peso medio pari a 80 g., sono state stabulate in vasche di vetroresina di 1 m³, alimentate con acqua di sorgente areata, ad una temperatura pari a 13°C, presso gli acquari sperimentali del Dipartimento di Scienze Animali (Università di Udine). I pesci provenivano da un allevamento del Trentino Alto Adige scelto in quanto privo di precedenti segnalazioni di lattococcosi. La sperimentazione ha avuto luogo da settembre a dicembre 2005 e durante tale periodo i pesci sono stati alimentati con mangime pellettato commerciale (1-2% p.v./giorno).

Preparazione degli antigeni batterici

WCs - Gli antigeni denominati WCs sono costituiti da cellule batteriche intere di *L. garvieae* (ceppo B05/3) ottenute mediante coltura in terreno BHIB (bioMérieux) per 24 ore a 22°C. I batteri sono stati inattivati con formalina tamponata (0,6%) in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente e overnight a 4°C; in seguito sono stati lavati mediante centrifugazione a 1800 giri per 45 minuti a temperatura ambiente e risospesi in PBS sterile alla concentrazione desiderata. La sospensione è stata aliquotata e conservata a -80°C.

AM - Gli antigeni di membrana sono stati preparati seguendo alcune metodiche riportate in bibliografia (Hancock & Gilmore, 2002; Salati *et al.*, 2005), parzialmente modificate. Cento ml di brodocoltura, ottenuta coltivando il ceppo B05/3 in BHI per 24 ore a 22°C, sono stati centrifugati a 1800 giri per 45 minuti a temperatura ambiente. Il precipitato è stato quindi risospeso in 10 ml di PBS sterile. Le cellule sono state trattate con 0,1 mg/ml di lisozima (Sigma) per 18 ore a 37°C, in seguito centrifugate a 1800 giri per 45 minuti a 10°C. Il surnatante è stato recuperato, filtrato (0,20 µm) e precipitato con etanolo 95% (1:3 vol/vol) overnight a 4°C. Si è proceduto quindi centrifugando a 1800 giri per 30 minuti a 4°C; il prodotto ottenuto è stato dializzato contro PBS overnight a 4°C, aliquotato e conservato a -80°C.

ECPs - Dopo semina del ceppo B05/3 in 100 ml di terreno BHI e 100 ml di terreno THB (Bacto™ Todd-Hewitt broth, Difco), le brodocolture sono state seguite per 4 giorni (a 22°C) ed ogni giorno è stato prelevato il precipitato costituito da batteri non vitali ed è stata aggiunta una pari quantità di terreno nuovo. Al termine del quarto giorno i prodotti extracellulari (ECPs) sono stati ottenuti centrifugando le brodocolture a 1800 giri per 45 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato recuperato e filtrato (0,20 µm), quindi precipitato con etanolo 95% overnight a 4°C. Dopo la precipitazione è stata fatta una centrifugazione a 10.000 giri per 20 minuti a 4°C ed in seguito il precipitato ottenuto da entrambi i terreni è stato unificato, risospeso in 10 ml di PBS sterile, dializzato overnight contro PBS a 4°C. La sospensione è stata aliquotata e conservata a -80°C.

Gli AM e gli ECPs sono stati inattivati con formalina tamponata 0,3% e neutralizzati con sodio metabisolfito al 15% prima dell'impiego per l'immunizzazione dei soggetti sperimentali.

Immunizzazione

L'immunizzazione è stata condotta a settembre ed ottobre 2005, dopo un periodo di acclimatazione dei pesci pari a 3 settimane, utilizzando le frazioni antigeniche purificate, come illustrato nella tabella 1.

I soggetti sono stati tenuti a digiuno per 48 ore prima del trattamento, che è stato condotto previa anestesia con Benzocaina (0,03 g/l) (Sigma Aldrich, Milano). L'inoculo è stato effettuato al giorno 0 per via intraperitoneale, utilizzando siringhe monouso sterili, seguito da un richiamo dopo 15 giorni.

Gruppo	N. soggetti	Antigene	Quantità iniettata
A	42	AM	50 µg/sogg.
B	42	WCs	1×10 ⁵ cellule/sogg.
C	42	ECPs	2.3 µg/sogg.
D	42	Controllo - PBS	100 µl/sogg.

Tabella 1 – Schema di immunizzazione.
 Table 1 – Diagram of immunization.

Prelievo dei sieri

Una settimana dopo il richiamo il sangue è stato prelevato dai soggetti appartenenti ai 4 gruppi sperimentali (10 soggetti/gruppo) previa sedazione con Benzocaina (0,03 g/l) (Sigma Aldrich, Milano). I sieri sono stati ottenuti mediante centrifugazione a 2000 giri per 10 minuti e conservati a -80°C fino al momento della valutazione.

Saggio di emoagglutinazione

Cellule batteriche di *L. garvieae*, ottenute da brodocoltura, sono state lavate con PBS e la densità ottica (D.O. _{620nm}) della sospensione è stata portata a 1 (1×10⁹ cellule/ml) mediante spettrofotometro. I sieri da analizzare sono stati sottoposti a diluizioni seriate da 1:10 a 1:320 in tampone PBS con formalina allo 0,3% (100 µl/pozzetto) in micropiastra. Successivamente sono stati aggiunti 25 µl/pozzetto della sospensione batterica, incubando la piastra a temperatura ambiente per 5 minuti e overnight a 4°C. L'agglutinazione è stata osservata mediante riscontro di un caratteristico sedimento sul fondo dei pozzetti e successiva classificazione dello stesso in base ad un criterio oggettivo riportato nella bibliografia di riferimento (Robertson, 1990).

Saggio ELISA

Il saggio ELISA per la titolazione degli anticorpi anti *L. garvieae* è stato realizzato seguendo una metodica descritta da Bakopoulos *et al.* (1997), modificata per quanto riguarda il sistema di rivelazione. La micropiastra da 96 pozzetti è stata rivestita con 100 µl/pozzetto di poli L-lisina 0,001% (Sigma) in tampone bicarbonato 0,1 M a pH 9,6, ed incubata per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con low salt wash buffer (LSWB), la piastra è stata rivestita con 100 µl/pozzetto di *L. garvieae* (cellule intere lavate con PBS, D.O._{620 nm}=1) ed incubata per 1 ora a temperatura ambiente. I batteri sono stati fissati aggiungendo 50 µl/pozzetto di glutaraldeide allo 0,05% in PBS, incubando per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con LSBW, è stato effettuato un blocco dei siti aspecifici aggiungendo 100 µl/pozzetto di siero-albumina bovina al 2% in PBS (incubazione overnight a 4°C). Dopo 3 lavaggi con high salt wash buffer (HSWB), sono stati aggiunti i sieri da saggiare (100 µl/pozzetto), diluiti 1:10, 1:25 e 1:50 in PBS con 0,1% di Tween 20, incubati per 1 ora a temperatura ambiente. In alcuni pozzetti, che costituiscono il bianco, è stata omessa l'aggiunta del siero. Dopo 5 lavaggi con HSWB, sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di anticorpo monoclonale anti Ig di trota diluito 1:33 in PBS con 0,1% di Tween 20 (Aquatic Diagnostic, F11, UK) ed incubati per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi con HSWB, ai pozzetti è stato aggiunto (100 µl) un anticorpo policlonale biotinilato anti Ig di topo (DAKO) diluito 1:2000 in PBS con 0,1% di Tween 20, incubato a 37°C per 1 ora. Come sistema rilevatore è stato impiegato un kit streptavidina-fosfatasi

alcalina (Sigma) diluito 1:2000 in PBS con 0,1% Tween 20, incubato per 1 ora a 37°C (100 µl/pozzetto). Il substrato utilizzato era pNPP (Sigma) alla concentrazione di 1 mg/ml in tampone glicina 0,1 M pH 10,4. La lettura della micropiastra è stata effettuata con multispettofotometro Tecan a 405 nm, dopo 15, 30 e 60 minuti di incubazione. Come controllo positivo è stato utilizzato un siero ottenuto immunizzando con *L. garvieae* (inattivato con formalina) soggetti di trota iridea. I dati ottenuti sono stati statisticamente elaborati mediante test T di Student ($p \leq 0,05$).

Elettroforesi e immunoblotting

L'elettroforesi è stata allestita secondo il metodo di Laemmli (Laemmli, 1970; Smith, 1987) con un gel di 1,5 mm di spessore (acrilamide/bis-acrilamide 3,75%/0,1%). Il gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue R. Dopo la corsa elettroforetica, il trasferimento delle proteine è avvenuto su nitrato di cellulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) in Mini Trans-blot cell (Biorad). Il nitrato è stato incubato per un'ora a 37°C con i sieri di trota prelevati dai 4 gruppi sperimentali, diluiti 1:10 in Tris Buffered Saline (TBS) con Tween 20 0,1%. Dopo opportuni lavaggi è stato aggiunto l'anticorpo monoclonale anti immunoglobuline di trota (Aquatic Diagnostic, U.K.) biotinilato diluito 1:500 in TBS con Tween 20 allo 0,1%. In seguito ad incubazione con streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina (Sigma) per 30 minuti a 37°C, è stato aggiunto il substrato precipitante BCIP/NBT (Sigma). I pesi molecolari delle bande evidenziate sono stati ottenuti mediante una retta di regressione elaborata con "Excel" utilizzando come riferimento un marcatore di peso molecolare standard.

Infezione sperimentale

Un ceppo di *L. garvieae* isolato da trota iridea è stato rivirulentato mediante due passaggi *in vivo* in trota iridea e quindi conservato in aliquote a -80°C. I batteri destinati all'infezione sperimentale sono stati coltivati in TSB a 24°C fino al raggiungimento della fase logaritmica di crescita, quindi lavati mediante centrifugazione a 2000 giri per 45 minuti e risospesi in PBS. La concentrazione batterica è stata determinata in fase preliminare mediante stima spettrofotometrica della densità ottica a 620 nm, quindi il numero effettivo di UFC/ml contenute nelle sospensioni inoculate è stato confermato mediante conta su terreno solido.

La quantità di batteri da impiegare per saggiare la protezione è stata determinata nel corso di una prova preliminare che ha previsto l'inoculo intraperitoneale di 2 dosi batteriche a due gruppi di trote iridea ospitati in acquario. Per realizzare il challenge, i gruppi sperimentali (A, B, C, D) sono stati trasferiti dallo stabulario del Dipartimento di Scienze Animali alla cabina di infezione presso il Laboratorio di Biologia Marina di Trieste. Il trasferimento è stato condotto utilizzando un veicolo adeguatamente allestito con vasche in vetroresina e bombola per l'ossigenazione dell'acqua. I pesci sono stati stabulati in vasche di vetroresina (140 litri), inserite in un impianto a ciclo aperto approvvigionato con acqua di fonte, filtrata con carbone attivo (T=18°C, ricambio 2 l/min). Nella fase di acclimatazione i pesci sono stati alimentati con mangime commerciale (1% del p.v./giorno). Il tempo intercorso dall'inizio dell'immunizzazione all'infezione è stato pari a 4 settimane. Il challenge è stato attuato, previa anestesia di tutti i soggetti mediante benzocaina (0,03 g/l), con iniezione intraperitoneale di $2,6 \times 10^5$ UFC/soggetto (200 µl), secondo lo schema riportato in tabella 2.

Gruppo	N. soggetti	Dose batterica
A - AM	28	2,6x10 ⁵ UFC/sogg. (200 µl)
B - WCs	27	2,6x10 ⁵ UFC/sogg. (200 µl)
C - ECPs	27	2,6x10 ⁵ UFC/sogg. (200 µl)
D - PBS	26	2,6x10 ⁵ UFC/sogg. (200 µl)

Tabella 2 – Schema di intervento con *Lactococcus garvieae* mediante iniezione intraperitoneale.
 Table 2 – Intervention diagram with *Lactococcus garvieae* by intraperitoneal injection.

La mortalità cumulativa è stata registrata per 10 giorni post-infezione. I soggetti morti in seguito all'infezione sono stati sottoposti ad esame necroscopico e batteriologico (coltura su TSA) per confermare la diagnosi di malattia. La protezione conferita dall'immunizzazione è stata valutata in termini di percentuale relativa di sopravvivenza (Amend, 1981):

$$\text{RPS} = [1 - (\% \text{ mortalità gruppo vaccinati} / \% \text{ mortalità gruppo controllo})] \times 100$$

I risultati sono stati analizzati statisticamente mediante test χ^2 .

RISULTATI

Valutazione della risposta anticorpale specifica mediante emoagglutinazione ed ELISA

I risultati del saggio di agglutinazione effettuato sui sieri prelevati dai quattro gruppi sperimentali (immunizzazione con WCs, ECPs e AM) non hanno evidenziato differenze significative tra i gruppi e rispetto al gruppo di controllo trattato con PBS (dati non riportati). La risposta anticorpale specifica è stata misurata anche mediante un sistema ELISA indiretto. Per ogni gruppo immunizzato e per il gruppo di controllo sono stati analizzati 10 sieri. La diluizione ottimale dei campioni scelta per l'elaborazione dei dati è stata 1:25. La lettura spettrofotometrica scelta come riferimento è stata quella a 30 minuti di incubazione.

Nella figura 1 sono rappresentati i risultati come medie di assorbanza (O.D. a 405 nm) per ciascun gruppo considerato. La lettura spettrofotometrica è stata pari 0,64 (\pm 0,12) nel gruppo di controllo, 0,6 (\pm 0,23) nel gruppo immunizzato con ECPs, 0,56 (\pm 0,2) nel gruppo immunizzato con WCs, 0,49 (\pm 0,2) nel gruppo immunizzato con AM. L'elaborazione statistica dei dati non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi.

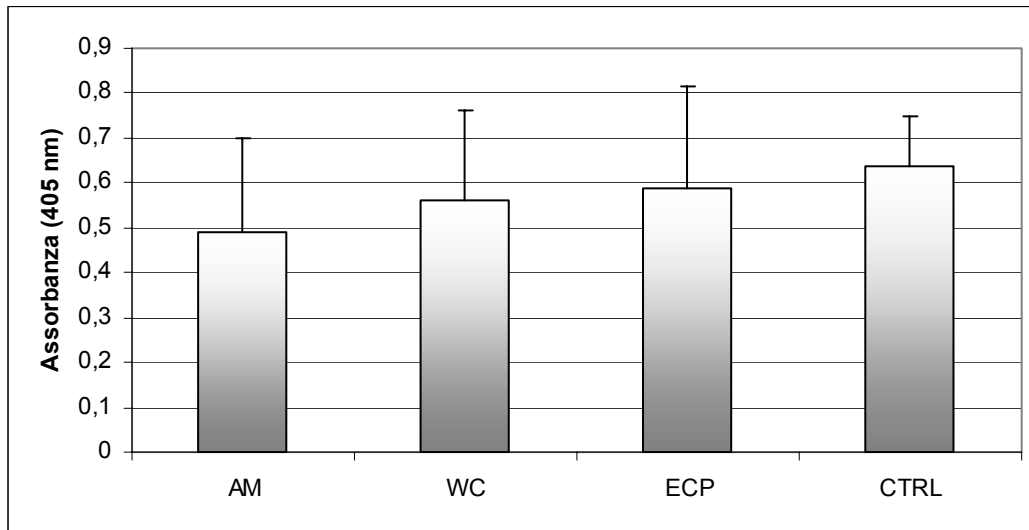


Figura 1 - Titolo anticorpale specifico per *Lactococcus garvieae* nel siero dei soggetti sperimentali. Le misurazioni sono espresse come medie di assorbanza (D.O. a 405 nm) e relative deviazioni standard per ciascun gruppo considerato (n=10): AM, WCs, ECPs e controllo.

Figure 1 - Specific antibody titre to Lactococcus garvieae in the serum of the experimental subjects. The values are expressed as mean absorbance (O.D. at 405 nm) and related standard deviation for each considered group (n=10): AM, WCs, ECPs and control.

Profilo elettroforetico degli antigeni batterici e valutazione mediante immunoblotting

La figura 2 riporta il tracciato elettroforetico relativo agli antigeni utilizzati per la prova di immunizzazione. Il peso molecolare delle bande evidenziate in ciascuna colonna è stato stimato in riferimento al marcatore di peso molecolare riportato nell'ultima colonna a destra del gel. Nel caso degli ECPs si evidenziano componenti peptidici principali a 70 kDa. Nel caso degli antigeni di membrana e WCs il profilo elettroforetico risulta complesso e costituito da numerose bande. Si evidenziano comunque alcune somiglianze. Le WC rispetto agli antigeni di membrana presentano in più una banda a 66 kDa e in meno le seguenti bande: 18, 37, 111, 115, 141, 151 e 156 kDa.

L'esito della immuno-rivelazione condotta utilizzando sieri ottenuti dal gruppo di controllo e dai gruppi immunizzati con i vari antigeni è illustrato nella figura 3. Si osserva che una banda di 23 kDa risulta molto evidente in WCs ed AM, con tutti gli antisieri utilizzati e anche con il siero di controllo. Una banda di 48 kDa è evidente nell'antigene WCs trattato con i sieri ottenuti dai soggetti di controllo e immunizzati con ECPs e WCs. Una banda a 102 kDa è presente in WCs ed AM, trattati con gli antisieri di controllo, anti WCs e anti AM.

Infezione sperimentale

Nella tabella 3 sono stati riassunti i risultati ottenuti in seguito alla prova di infezione realizzata per valutare la protezione. Vengono riportati il numero di morti giornaliero, fino a 10 giorni e il numero di morti totale. La mortalità viene espressa in percentuale e la protezione conferita dal vaccino come percentuale relativa di sopravvivenza (RPS).

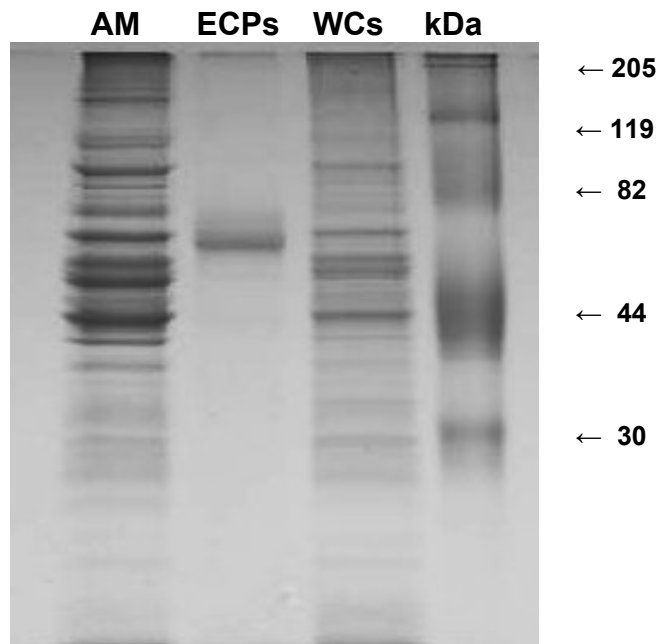


Figura 2 - Profilo SDS- PAGE degli antigeni di *Lactococcus garvieae* utilizzati per l'immunizzazione dei soggetti sperimentali. I numeri a destra del gel indicano i pesi molecolari di riferimento.

Figure 2 - SDS-PAGE profile of the *Lactococcus garvieae* antigens employed for the immunization of the experimental fish. The numbers on the right side of the picture are the reference molecular weights.

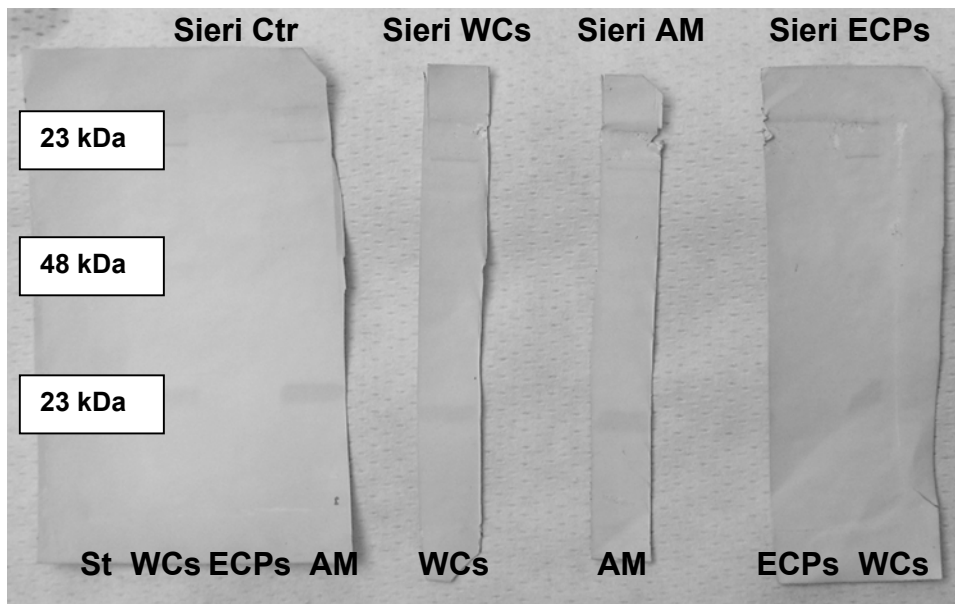


Figura 3 - Immuno-blotting del gel SDS-PAGE tramite il quale sono stati analizzati i sieri ottenuti dai soggetti immunizzati con WCs, AM, ECPs e i sieri di controllo. Gli antigeni di riferimento sono indicati dalle sigle poste alla base della foto.

Figure 3 - Immuno-blotting of the protein profiles revealed by the SDS-PAGE analysis. The abbreviations in the upper part of the picture indicate the fish sera employed (Ctr, or specific for WCs, AM, ECPs). The abbreviations in the lower part of the picture indicate the reference antigens.

Challenge				
Giorni post-infezione	Soggetti vaccinati			Soggetti di controllo
	Antigene ECPs	Antigene WCs	Antigene AM	PBS
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	1	1	3	4
5	0	0	0	0
6	11	0	7	14
7	3	0	3	3
8	0	0	3	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
Totale	15	1	16	22
Mortalità %	55% ^a	4% ^b	57% ^a	85 % ^c
RPS	35%	95%	33%	-

Tabella 3 - Mortalità registrata nei soggetti immunizzati e di controllo, in seguito ad infezione sperimentale con *Lactococcus garvieae* (challenge intraperitoneale con $2,6 \times 10^5$ UFC/sogg) realizzata 4 settimane dopo la vaccinazione. I valori di RPS esprimono la protezione conferita dal vaccino.

Test χ^2 , differenze significative per $p \leq 0,01$.

Table 3 - Mortality of control and immunized fish, recorded after the experimental infection with Lactococcus garvieae (intraperitoneal challenge with 2.6×10^5 CFU/fish), performed 4 weeks post-vaccination.

RPS values indicate the protection conferred by the vaccine.

Chi-square test, significant differences for $p \leq 0.01$.

Infine, nella figura 4 viene rappresentata la mortalità cumulativa per ogni gruppo considerato. La mortalità del gruppo di controllo è stata pari all'85%, quella del gruppo immunizzato con WCs 4%, quella del gruppo immunizzato con ECPs 55% e quella del gruppo immunizzato con AM 57%. I trattamenti hanno garantito le seguenti percentuali relative di sopravvivenza: 95% per WCs; 35% per ECPs; 33% per AM. Nei soggetti moribondi sono stati evidenziati i segni clinici e le lesioni anatomopatologiche caratteristici della malattia. L'esame batteriologico ha consentito il reisolamento di *L. garvieae* dai soggetti moribondi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella maggior parte dei casi i vaccini proposti per la profilassi della lattococcosi sono costituiti da FKC, ossia cellule intere di *Lactococcus garvieae* inattivate con formalina, che assicurano significativi livelli di protezione contro la malattia, soprattutto se somministrati in abbinamento a sostanze adiuvanti (Ravelo *et al.*, 2006). La produzione di questo tipo di antigene, relativamente semplice, sembra per ora garantire un buon rapporto tra costi e benefici in termini di protezione, ma vari ricercatori hanno iniziato a studiare l'impiego di formulazioni nelle quali compaiano componenti più specifiche del batterio, in grado di conferire una risposta immunitaria più efficace nella protezione dalla malattia. Fra questi è

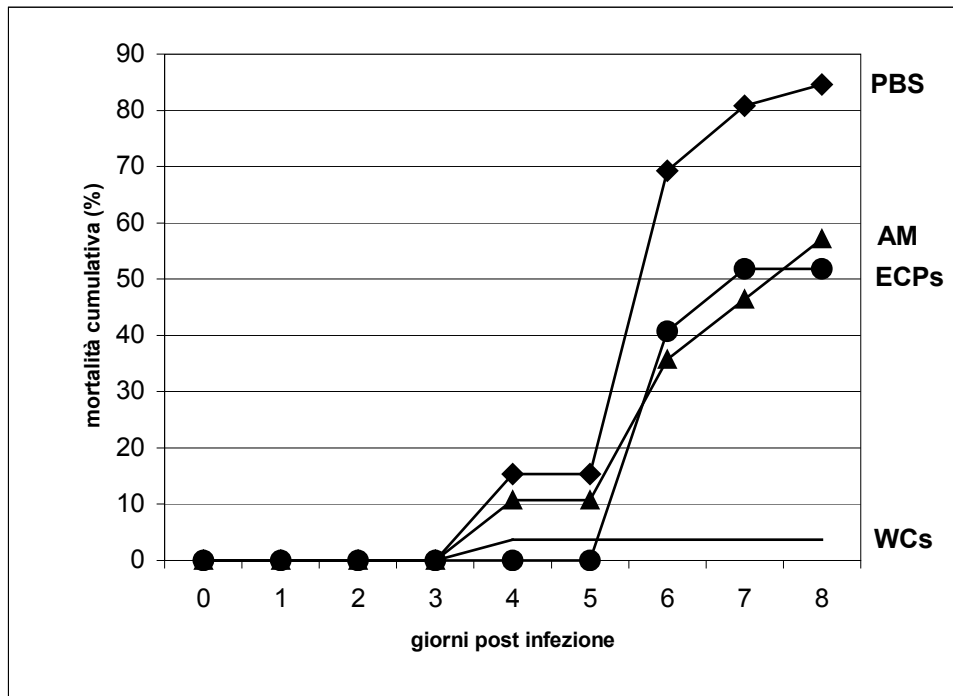


Figura 4 - Mortalità cumulativa registrata nei soggetti immunizzati (AM, ECPs, WCs) e nei soggetti di controllo (PBS), dopo infezione sperimentale con *Lactococcus garvieae*.

Figure 4 - Cumulative mortality of control (PBS) and immunized fish (AM, ECPs, WCs), recorded after the experimental infection with *Lactococcus garvieae*.

utile citare: Barnes & Ellis (2004) che hanno studiato il ruolo della capsula nella fissazione del complemento di trota iridea da parte di *L. garvieae*; Salati *et al.* (2005), che hanno descritto la risposta immunitaria in orate (*S. aurata*) immunizzate con vari antigeni (FKC, estratti di membrana, proteina M); Ravelo *et al.* (2003) che hanno valutato il ruolo della capsula nella protezione conferita da vaccini intraperitoneali in trota iridea; Ooyama *et al.* (2006) che hanno proposto l'impiego, in ricciola (*Seriola quinqueradiata*), di un vaccino vivo attenuato costituito da batteri privi di capsula; Ooyama *et al.* (2002), che hanno studiato, sempre in ricciola, l'immunogenicità di antigeni di superficie di *L. garvieae*.

Nell'ambito di questa indagine un ceppo virulento di *L. garvieae* isolato da trota iridea è stato utilizzato per la preparazione di alcuni antigeni, analizzati elettroforeticamente e quindi impiegati per immunizzare trote iridee di taglia suscettibile alla malattia, al fine di valutare alcuni aspetti della risposta immunitaria e la protezione conferita nei confronti della lattococcosi.

Gli antigeni purificati sono: prodotti batterici extracellulari (ECPs); cellule batteriche intere inattivate con formalina (WCs); antigeni di membrana (AM); proteine M-like. Tre di questi (WCs, ECPs, AM) sono stati destinati all'immunizzazione dei soggetti sperimentali. La scelta degli autori di impiegare tali sostanze si è basata su informazioni raccolte dalla bibliografia recente, che descrive l'effetto immunogeno e protettivo indotto dalle stesse in altre specie ittiche suscettibili alla lattococcosi (Kusuda & Salati, 1999; Salati *et al.*, 2005).

Le cellule batteriche intere di *L. garvieae* e le singole frazioni sono state sottoposte ad analisi elettroforetica mediante SDS-PAGE. Nel caso degli ECPs si evidenziano componenti peptidici principali a 70 kDa, che non vengono evidenziati negli altri traccianti esaminati (WCs e AM). Nel caso degli antigeni di membrana e delle WCs il profilo elettroforetico risulta simile e paragonabile a quanto già osservato da altri autori (Schmidtke & Carson, 1999; Shin *et al.*, 2006) nell'ambito di indagini biochimiche su ceppi di *L. garvieae*. Per quanto riguarda l'analisi tramite immunoblotting, la bande con peso molecolare prossimo a 70 kDa, evidenziate come componenti della frazione antigenica ECPs, non sono oggetto di legame da parte dei sieri analizzati. Questo indica che tali componenti, rilasciate nel terreno di coltura da *L. garvieae*, non sono in grado di legare anticorpi di trota iridea. Nel caso degli antigeni di membrana e delle cellule intere, fra le numerose bande evidenziate tramite SDS-PAGE, alcune in particolare vengono rivelate dall'aggiunta del siero di trota. Si osserva che una banda di 23 kDa risulta molto evidente in WCs ed AM, con tutti gli antisieri utilizzati e anche con il siero di controllo. La banda a 48 kDa è evidente nell'antigene WCs trattato con i sieri ottenuti dai soggetti di controllo e immunizzati con ECPs e WCs. La banda a 102 kDa è presente in WCs ed AM, trattati con gli antisieri di controllo, anti WC e anti-AM. Un dato particolare che emerge da queste valutazioni è che anche i sieri di controllo, ossia ottenuti da trote iridee non sottoposte ad alcun trattamento immunizzante, contengono immunoglobuline in grado di legarsi con alcune componenti proteiche del batterio. Le bande evidenziate sono quelle a peso molecolare approssimativo di 23, 48 e 102 kDa.

Un'osservazione simile era già emersa nel corso della ricerca condotta da Barnes *et al.* (2001). Questi autori avevano analizzato tramite elettroforesi e immunoblotting il legame aspecifico delle immunoglobuline di trota iridea nei confronti di proteine di membrana espresse da ceppi capsulati e non di *L. garvieae*. In particolare gli autori avevano riconosciuto una banda di peso molecolare approssimativo di 30 kDa, espressa solo dai ceppi capsulati, che veniva legata in modo non specifico dal siero di controllo. Nelle indagini condotte dagli stessi autori un'altra banda evidenziata dall'immunoblotting, sempre in modo non specifico, aveva un peso molecolare approssimativo di 52 kDa. La spiegazione fornita per questo risultato era che le immunoglobuline di trota possono legare alcune proteine espresse da batteri Gram positivi, come *L. garvieae*, utilizzando la porzione Fc. La capacità dei batteri di legare proteine sieriche dell'ospite, comprese le immunoglobuline, attraverso meccanismi di riconoscimento non specifici è considerato un potenziale fattore di virulenza (Fischetti, 2000). Tale modalità di legame può infatti limitare meccanismi volti alla eliminazione del patogeno, quali la fissazione del complemento e la opsonizzazione seguita da fagocitosi.

L'applicazione della tecnica di agglutinazione per stabilire la risposta anticorpale specifica nei confronti di *L. garvieae* era già stata proposta da altri autori (Barnes *et al.*, 2001, in trota iridea; Salati *et al.*, 2004, in orata). Nel corso di questa indagine la valutazione è stata condotta adottando sia questa metodica, sia un saggio ELISA indiretto, considerato generalmente più sensibile, ma mai applicato per la valutazione della risposta umorale contro *L. garvieae* in trota iridea. Entrambi i sistemi hanno rivelato valori di risposta anticorpale elevati anche nel caso dei sieri ottenuti dai soggetti non immunizzati (inoculati solo con PBS). La particolarità di quanto osservato sembra confermare quanto già rilevato tramite l'immunoblotting, ossia che le immunoglobuline contenute nel siero di trota possono legarsi ad un antigene batterico espresso da *L. garvieae*. Questi dati sottolineano che i metodi sierologici, quali agglutinazione, ELISA e Western Blot non sono sempre attendibili per la valutazione della risposta anticorpale specifica nei confronti del patogeno utilizzato nell'ambito di questa prova.

Considerati i limiti dei risultati sierologici appena descritti, si ritiene utile proporre quale metodo definitivo per stabilire la protezione indotta dagli antigeni impiegati la prova di

infezione. In sintesi le mortalità riscontrate nei gruppi sperimentali sono state: 85% nel gruppo di controllo; 4% nel gruppo immunizzato con WCs; 55% nel gruppo immunizzato con ECPs; 57% nel gruppo immunizzato con AM. I trattamenti hanno pertanto garantito le seguenti percentuali relative di sopravvivenza: 95% per WCs; 35% per ECPs; 33% per AM. Queste percentuali suggeriscono che le cellule batteriche intere inattivate con formalina (WCs) conferiscono la maggiore protezione tra gli antigeni impiegati. Anche le frazioni ECPs e AM sono risultate efficaci in tal senso, seppure con RPS più basse. Al fine di poter confrontare con maggiore attendibilità l'efficacia delle tre formulazioni utilizzate sarebbe tuttavia necessario poter uniformare le quantità somministrate al singolo individuo e le unità di misura con cui tali quantità vengono espresse. Inoltre, visto l'esito delle prove di vaccinazione, sarebbe interessante formulare un vaccino comprensivo di cellule batteriche e antigeni di membrana o prodotti extracellulari, per ottenere un potenziamento dell'effetto protettivo.

Confrontando le osservazioni relative alla risposta anticorpale con i dati di protezione registrati nella prova di infezione, si evidenzia un aspetto contrastante. I soggetti immunizzati con il protocollo proposto in questa indagine non hanno sviluppato una risposta umorale specifica quantificabile con saggi *in vitro*, ma sono risultati protetti nei confronti della malattia. Probabilmente la risposta anticorpale specifica era presente, ma non evidenziabile a causa della possibile aspecificità di legame tra alcune componenti proteiche di *L. garvieae* e la porzione Fc delle immunoglobuline di trota iridea. Inoltre, nella risposta protettiva possano avere un ruolo significativo altri meccanismi, quali la difesa immunitaria aspecifica e in particolar modo quella cellulare. Infatti nei soggetti immunizzati con ECPs, pur non riscontrando (tramite immuno-blotting) la presenza di immunoglobuline specifiche e non essendoci l'interferenza esercitata dalle proteine batteriche di legame aspecifico, è risultata evidente la resistenza all'infezione. In base a queste considerazioni, gli ECPs potrebbero aver attivato dei sistemi di difesa immunitaria di tipo aspecifico. In merito a questo aspetto, l'unico riferimento bibliografico possibile è quello di Salati *et al.* (2005). L'immunizzazione di orate con cellule batteriche inattivate e con proteina M aveva stimolato l'attività di fagocitosi dei leucociti isolati da sangue periferico, ma solo a partire da 44 e 66 giorni dopo l'immunizzazione. Tali osservazioni possono rappresentare un punto di partenza per ulteriori approfondimenti finalizzati a stabilire, in alternativa alla risposta anticorpale specifica, il ruolo dell'immunità aspecifica nella difesa della malattia.

RINGRAZIAMENTI

La ricerca è stata finanziata dalla regione Friuli Venezia Giulia (L.R. 164/98). Gli autori desiderano ringraziare il Sig. Gian Pietro Martincig, Dipartimento di Scienze Animali (Università di Udine), per il contributo fornito nel corso delle prove sperimentali.

BIBLIOGRAFIA

Amend D.F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *International symposium on fish biologics: serodiagnostic and vaccines. Develop. Biol. Standard.*, 49: 447-454.

Austin B. & Van Pouce A. (1993). A gram-positive "lactic-acid" bacterium causing steady mortalities in farmed rainbow trout, *O. mykiss* Walbaum, in the U.K. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13: 114-118.

- Bakopoulos V., Volpatti D., Adams A., Galeotti M. & Richards R. (1997). Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse and sea bass, *D. labrax*, to *P. damsela* subsp. *piscicida*, the causative agent of fish Pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 161-174.
- Barnes A.C. & Ellis A. (2004). Role of capsule in serotypic differences and complement fixation by *Lactococcus garvieae*. *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 207-214.
- Barnes A.C., Guyot C., Hansen B.G., Mackenzie K., Horne M.T. & Ellis A.E. (2001). Resistance of serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*O. mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 12: 1-14.
- Bercovier H., Ghittino C. & Eldar A. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with Streptococci and related organisms. *Fish Vaccinology. Develop. Biol. Standard., Basel, Karger*, 90: 153-160.
- Ceschia G., Giorgetti G., Mazzolini E., Danielis L. & Passera A. (1997). Vaccinazione contro la Streptococcosi in trota iridea (*O. mykiss*) allevata. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 22: 2-8.
- Domenech A., Prieta J., Fernandez-Garayzabal J.F., Collins M.D., Jones D. & Dominguez L. (1993). Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. *Microbiologia (SEM)*, 9: 63-68.
- Domenech A., Garcia J.A., Blanco M., Gibello A., Fernandez-Garayzabal J.F., Liebana P., Albendea C., Moreno M.A. & Dominguez L. (1999). A reliable immersion vaccine against *Lactococcus garvieae*. *Proceedings 9th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Rhodes (Greece), 19-24 September 1999*: 0-128.
- Eldar A. & Ghittino C. (1999). *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar but different diseases. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 227-231.
- Eldar A., Ghittino C., Asanta L., Bozzetta E., Gorla M., Prearo M. & Bercovier H. (1996). *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningo-encephalitis in fish. *Curr. Microbiol.*, 32: 85-88.
- Fischetti V.A. (2000). Surface proteins on Gram positive bacteria. *In: Gram positive Pathogens (V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy & J.I. Rood, eds) Washington, DC. ASM Press*: 11-24.
- Ghittino C., Eldar A., Prearo M., Bozzetta E., Livvof A. & Bercovier H. (1995). Comparative pathology and experimental vaccination in diseased rainbow trout infected by *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*. *Proceedings 7th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Palma de Mallorca, Spain., 10-15 September 1995*: 27.
- Gusmani L., Buonasera E., Edalucci M., Vojnovich D. & Galeotti M. (2004). Approccio alla vaccinazione orale contro la lactococcosi. *Atti XI^o Convegno Nazionale Società Italiana di Patologia Ittica, Finale Ligure (SV), 7-9 ottobre 2004*: 20.
- Hancock L.E. & Gilmore M.S. (2002). The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *PNSA*, 99, 3: 1574-1579.
- Kusuda R., Kawai K., Salati F., Braaner C.R. & Fryer J.L. (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 406-409.

- Kusuda R. & Salati F. (1999). *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. In: *Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections, Vol. 3. Woo and Bruno Eds., CABI Publishing: 303-317.*
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685.
- Manfrin A., Prearo M., Volpatti D. & Fabris A. (2006). L'utilizzo di vaccini nel controllo della lattococcosi in trotilcoltura. *Atti XIII Convegno Nazionale S.I.P.I., 26-28 ottobre 2006, Abano Terme (PD): 34.*
- Ooyama T., Hirokawa Y., Minami T., Yasuda H., Nakai T., Endo M., Ruangpan L. & Yoshida T. (2002). Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. Aquat. Org.*, 51: 169-177.
- Ooyama T., Shimahara Y., Nomoto R., Yasuda H., Iwata K., Nakamura A., Itami T. & Yoshida T. (2006). Application of attenuated *Lactococcus garvieae* strain lacking a virulence-associated capsule on its cell surface as a live vaccine in yellowtail *Seriola quinqueradiata* Tamminck and Schlegel. *J. Appl. Ichthyol.*, 22: 149-152.
- Palacios M.A., Zamora M.J., Velazquez J., Zamora E. & Duran A. (1993). Vaccination against *Streptococcus* spp.: laboratory and field trials results. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 13: 7-10.
- Ravelo C., Magariños B., Herrero M.C., Costa L., Toranzo A.E. & Romalde J.L. (2006). Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 251: 153-158.
- Ravelo C., Magariños B., Romalde J.L. & Toranzo A.E. (2003). Capsular antigens are needed for development of effective vaccines against lactococcosis. *Proceedings 11th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, St. Julian, Malta, 21-26 September 2003: P-217.*
- Ravelo C., Magariños B., Toranzo A. & Romalde J.L. (2001). Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 21: 136-144.
- Roberson B.S. (1990). Bacterial agglutination. In: *Techniques in Fish Immunology, Stolen J.S., van Muiswinkel W. B. (Eds.). SOS Publications, USA: 81-86.*
- Romalde J.L., Luzardo-Alvarez A., Ravelo C., Toranzo A.E. & Mendez J.B. (2004). Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*, 236: 119-129.
- Salati F., Angelucci G., Viale I. & Kusuda R. (2005). Immune response of gilthead sea bream *Sparus aurata* L., to *Lactococcus garvieae* antigens. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 25, 1: 40-48.
- Schmidtke L.M. & Carson J. (1999). Induction, characterisation and pathogenicity in rainbow trout *O. mykiss* (Walbaum) of *Lactococcus garvieae* L-forms. *Vet. Microbiol.*, 69: 287-300.
- Shin G.W., Palaksha K.J., Yang H.H., Shin Y.S., Kim Y.R., Lee E.Y., Kim Y.J., Oh M.J., Yoshida T. & Jung T.S. (2006). Discrimination of streptococcosis agents in olive flounder. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 26, 2: 68-79.
- Smith J.A. (1987). Electrophoretic separation of proteins. In: *Current protocols in molecular biology (Ausubel F.M. et Al. Eds.). Green P.A. and Willey Interscience, New York: unit 10.2.*