

Tolleranza al trattamento termico di ceppi di *Lactococcus garvieae* isolati da trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)

Tolerance to heat treatment of Lactococcus garvieae strains isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)

Amedeo Manfrin^{1*}, Michela Corrà¹, Francesco Franceschini²,
Mirco Volpin¹, Roberto Perin¹, Silvia Friso¹, Katia Quattieri¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

² AULSS n. 9 Dipartimento Prevenzione - Servizi Veterinari - Treviso

RIASSUNTO – Nel presente lavoro sono stati sottoposti a trattamento termico 10 ceppi di *Lactococcus garvieae*, isolati dalla muscolatura di trote iridee destinate alla lavorazione (filettatura e affumicamento) e al consumo diretto, per valutarne la resistenza alle temperature elevate. Con tali ceppi batterici si sono preparate delle sospensioni a titolo noto (10^9 ufc/mL) che sono state sottoposte a trattamento termico a 50° C, 60° C, 70° C e 80° C, per intervalli di tempo diversi: 5, 10, 20 e 30 minuti. La semina in piastra delle sospensioni dopo il trattamento ha permesso di evidenziare i ceppi batterici ancora vitali e di selezionare quelli con più spiccati caratteri di resistenza. Con quest'ultimi sono state preparate nuove sospensioni a diversa diluizione (da 10^8 a 10^2 ufc/mL) che sono state sottoposte a shock termico a 70° C e 75° C per 10, 20 e 30 minuti. La prova sperimentale ha evidenziato che tutti i ceppi batterici sono inattivati a 75° C e 80° C, mentre si è osservata crescita batterica, in percentuali variabili dal 37,5 al 100% dopo lo shock termico effettuato a 50° C, 60° C e 70° C. Questa particolare resistenza di *L. garvieae* alle alte temperature pone alcuni quesiti che richiederanno ulteriori indagini e sperimentazioni, in quanto sia il processo di affumicamento a freddo che quello a caldo, sia la cottura delle carni di trota, difficilmente consentono il raggiungimento "a core" di temperature superiori ai 70° C. Fortunatamente non esistono segnalazioni di tossinfezioni alimentari legate al consumo di prodotti ittici contaminati da *L. garvieae*, ma la sua capacità di persistere nelle carni deve spingerci ad approfondire le ricerche sulla sua reale potenzialità zoonosica.

SUMMARY - In the present study, 10 *Lactococcus garvieae* strains isolated from muscle of rainbow trout, destined for filleting and smoking and for direct consumption, were subjected to heat treatment in order to assess their resistance to high temperatures. Suspensions of known titre (10^9 ufc/mL) were prepared with the 10 bacterial strains and subjected to heat treatment at 50° C, 60° C, 70° C and 80° C, for differing time intervals of 5, 10, 20 and 30 minutes. Suspensions seeded on plates after treatment showed still vital bacterial strains, and those with more marked resistance were selected. These were used to prepare new suspensions at various dilutions (from 10^8 to 10^2 ufc/mL), and were in turn subjected to heat treatment at 70° C and 75° C for 10, 20 and 30 minutes. The results obtained showed that all bacterial strains were inactivated at 75° C and 80° C, but bacterial growth was still observed, in percentages varying between 37.5% and 100% after heat treatment at 50° C, 60° C and 70° C. This particular resistance of *L. garvieae* to high temperatures presents some problems, which will have to be resolved by means of further examinations and experiments, since the smoking processes and the cooking of trout flesh does not necessarily mean that temperatures over 70° C are reached. Fortunately, there are no reports of food poisoning due to fish products contaminated by *L. garvieae*, but its capacity for persisting in the flesh of trout must lead to further research regarding its true potential capacity for causing disease in man.

Key words: *Lactococcus garvieae*, Rainbow trout, Heat resistance

* Corresponding Author: Dott. Amedeo Manfrin, c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD) – Italy. Tel. 049-8084295; Fax 049-8084392; E-mail: manfrin@izsvenezie.it

INTRODUZIONE

La lattococcosi è diventata, a partire dai primi anni '90, la principale patologia di natura batterica che colpisce la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Italia, soprattutto nelle fasi di ingrasso. L'agente eziologico della malattia è *Lactococcus garvieae*, un cocco Gram positivo, catalasi negativo, che cresce bene in Agar Sangue tra 4° C e 45° C, con formazione di piccole colonie biancastre circondate da un alone di α emolisi, in grado di replicarsi anche a pH 9,6 e al 6,5 % di NaCl. I ceppi isolati finora in Italia sembrano appartenere ad un unico sierotipo (Eldar *et al.*, 1999) ed inoltre *L. garvieae* risulta particolarmente virulento. Ghittino *et al.* (2002) hanno stabilito una DL₅₀ di 2×10^2 ufc/pesce in trote iridee di 150 g. mantenute a 16° C ed inoculate per via endoperitoneale. Tale patogeno è in grado di causare mortalità, in soggetti a fine ciclo produttivo, del 30-50% con gravi ripercussioni economiche per l'allevatore (Prearo *et al.*, 2001).

L'emergenza idrica degli ultimi anni ed il graduale, ma continuo, innalzarsi della temperatura media terrestre (global warming), fanno inoltre temere che nei prossimi anni tale patologia interesserà ancora pesantemente la produzione nazionale, perché tale malattia insorge prevalentemente con temperature dell'acqua superiori ai 14-15° C (Ghittino *et al.*, 1998; 2002). Una precedente indagine (Manfrin *et al.*, 2003) ha altresì messo in evidenza la presenza di *L. garvieae* in trote stabulate nelle vasche di pre-macellazione di alcuni stabilimenti per la lavorazione dei prodotti ittici situati nel Nord Est d'Italia. Il 43% dei soggetti analizzati sono risultati positivi.

In considerazione della notevole patogenicità per la trota e poiché alcune segnalazioni bibliografiche ipotizzano per tale microrganismo un ruolo di potenziale patogeno per l'uomo (Elliott *et al.*, 1991; Fefer *et al.*, 1998; James *et al.*, 2000; Mofredj *et al.*, 2000), soprattutto in soggetti immunocompromessi, con la presente indagine è stata studiata la resistenza al trattamento termico di questi ceppi di *L. garvieae* isolati dalla muscolatura di trote iridee destinate alla lavorazione (filettatura e affumicamento) e al consumo diretto, per valutarne la capacità di resistenza alle temperature elevate.

Inoltre, allo scopo di saggiarne l'eventuale patogenicità per i mammiferi a sangue caldo, alcuni ceppi sono stati inoculati in topini di laboratorio.

MATERIALI E METODI

Per il nostro studio sono stati utilizzati 10 ceppi di *L. garvieae*, isolati in un precedente lavoro dalla muscolatura di trote iridee stabulate nelle vasche di pre-macellazione di un impianto di lavorazione dei prodotti ittici e che presentavano tipici sintomi e lesioni da lattococcosi (Manfrin *et al.*, 2003).

I fase

Con tali ceppi batterici sono state preparate delle sospensioni in Heart Infusion Broth (HIB) aventi titolo pari a 10^9 u.f.c./mL, che sono state sottoposte a trattamento termico mediante immersione in bagno termostatico a 50° C, 60° C, 70° C e 80° C ciascuno, per intervalli di tempo diversi: 5, 10, 20 e 30 minuti. Prima del trattamento termico ciascuna sospensione è stata aliquotata in quattro provette da 1 mL. Successivamente al trattamento termico, partendo da ciascuna brodocoltura, sono stati seminati 10 μ l di sospensione in piastre di Agar Sangue, a loro volta incubate per 48 ore a 37° C \pm 2° C.

I ceppi in esame sono stati suddivisi in 2 gruppi: termolabili, se dopo tale periodo di incubazione non c'era alcuna crescita di colonie sulla piastra e termoresistenti tutti gli altri.

La resistenza dei 10 ceppi alle differenti temperature e tempi di esposizione è stata espressa come percentuale di vitalità.

II fase

I tre ceppi risultati maggiormente resistenti sono stati utilizzati per preparare, da ciascuno di essi, 7 sospensioni a diverse diluizioni (da 10^8 a 10^2 u.f.c./mL) sempre in quattro aliquote.

Queste sono state sottoposte, con la stessa metodica precedentemente descritta, a trattamento termico a 70°C e 75°C ciascuno per 10, 20 e 30 minuti.

In aggiunta, al fine di escludere che il trattamento termico avesse determinato solo una parziale inattivazione di *L. garvieae*, ciascuna provetta è stata reincubata a $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ per 24 e 48 ore. Successivamente, da ciascuna di esse, sono stati prelevati e seminati in Agar Sangue 10 μl di sospensione batterica. Dopo incubazione della piastra a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ per 48 ore, il campione è stato considerato positivo se c'era la presenza anche di una singola colonia α emolitica, negativo se c'era la totale assenza di crescita.

Prova biologica su topino

La prova di patogenicità è stata eseguita su 9 gruppi di 3 topini bianchi C1 Swiss di 20 g. inoculati per via intraperitoneale con 0,2 ml delle seguenti tipologie di prodotto, ottenute ciascuna a partire dai tre ceppi maggiormente resistenti allo shock termico:

- una sospensione batterica in Heart Infusion Broth (HIB) avente titolo di 10^9 cellule/mL;
- il surnatante di tali brodocolture ottenuto dopo centrifugazione a 4000 rpm per 20 minuti e filtrazione con filtri millipore 0,22 μm per evidenziare eventuali esotossine;
- il surnatante ottenuto dopo congelamento per 1 ora e scongelamento, al fine di rompere la parete cellulare, centrifugazione a 4000 rpm per 20 minuti e filtrazione tramite filtri millipore 0,22 μm , per ricercare l'eventuale presenza di endotossine.

Il controllo era costituito da altri 3 gruppi: in uno è stata iniettata soluzione fisiologica, nel secondo HIB sterile, mentre il terzo è stato tenuto in osservazione per verificare che non ci fossero condizioni ambientali sfavorevoli che potessero alterarne il comportamento. Tutti gli animali sono stati controllati 2-3 volte/die per 15 gg.

RISULTATI

I risultati della prima fase sono riportati nel Grafico 1.

Nessun ceppo di *L. garvieae*, sebbene predisposto in 4 aliquote, è cresciuto dopo trattamento a 80°C sia per 5, 10, 20 che per 30 minuti. A 70°C c'è stata ricrescita nel 60%, 37,5%, 2,5% dei casi dopo 5', 10' e 20' rispettivamente, mentre dopo 30' di trattamento tutti i ceppi sono risultati inattivati. A 60°C si è avuta ricrescita nel 100%, 47,5%, 60% e 37,5% dei casi dopo 5', 10, 20' e 30' rispettivamente, mentre a 50°C le percentuali di positività erano del 100% indipendentemente dal tempo di esposizione. I risultati della II fase sono riportati nel Grafico 2.

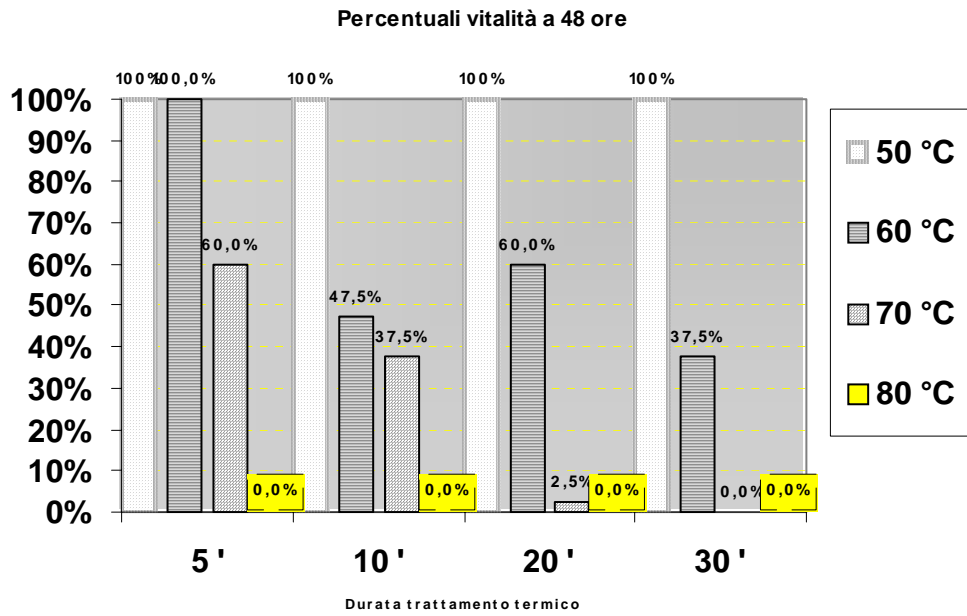


Grafico 1 – Percentuali di vitalità dei 10 ceppi alle differenti temperature e tempi di esposizione.
 Graphic 1 - Viability percentage of 10 strains at different temperature and time of exposure

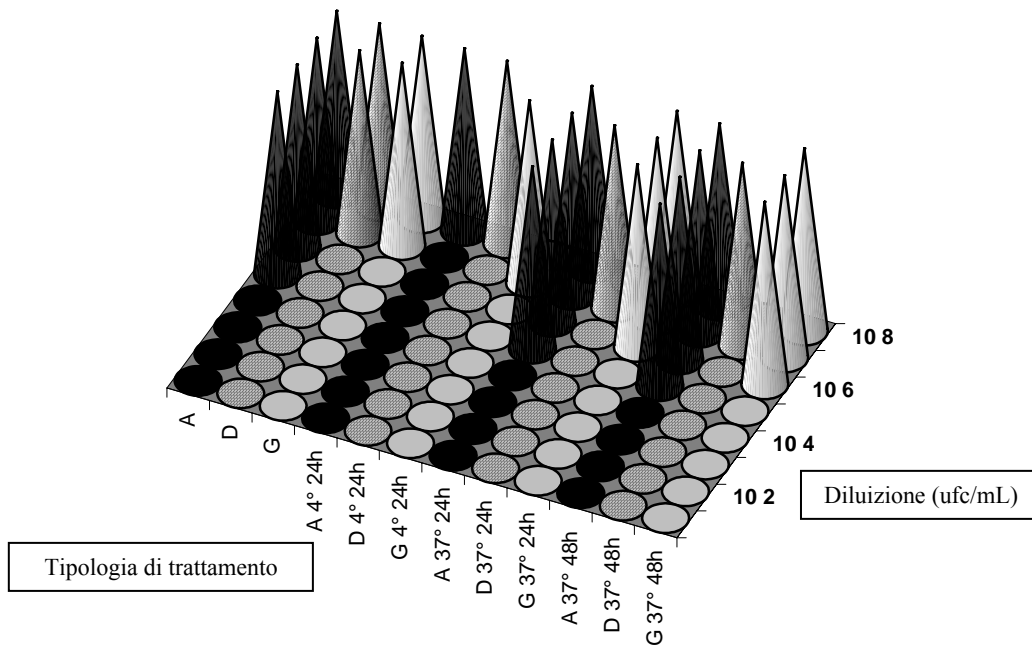


Grafico 2 - Vitalità dei ceppi A, D e G alle diverse diluizioni dopo trattamento termico a 70° C.
 Graphic 2 - Viability of strains A, D and G at different dilutions after heat treatment at 70° C

I 3 ceppi percentualmente più resistenti (A, D e G) dopo trattamento a 75° C per 10, 20 e 30 minuti oppure a 70° C per 20 e 30 minuti sono risultati completamente inattivati. Dopo lo shock termico a 70° C per 10 minuti, invece, la ricrescita è avvenuta in modo differenziato a seconda del periodo di reincubazione della brodocoltura.

Se la semina è stata effettuata subito dopo lo shock termico, il ceppo A ha presentato ricrescita alle diluizioni comprese tra 10^5 e 10^8 , i ceppi D e G tra 10^7 e 10^8 . Se dopo il trattamento con calore le sospensioni batteriche sono state reincubate a 4° C per 24 ore, la ricrescita dei ceppi A e D è avvenuta solo alla massima diluizione 10^8 ed il ceppo G solo a 10^7 mentre dopo 48 ore si è ottenuta la completa inattivazione dei microrganismi. Se dopo lo shock termico si è effettuata una nuova incubazione per 24 ore a 37° C, il ceppo A è ricresciuto tra 10^5 e 10^8 , il ceppo D solo a 10^7 e il ceppo G tra 10^6 e 10^8 . Esattamente sovrapponibili i dati di ricrescita se l'incubazione, anziché di 24 ore, era stata di 48 ore.

Prova biologica

Ad eccezione di un momentaneo stato di torpore di alcuni topini, probabilmente dovuto allo stress della manipolazione, nessun soggetto ha presentato sintomatologia o è morto. All'esame anatomo-patologico, solo i topini inoculati con 0,2 ml della sospensione batterica ottenuta a partire dal ceppo A presentavano una modesta splenomegalia e da tale organo è stato possibile reisolare *L. garvieae* in purezza.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La streptococcosi causata da *Lactococcus garvieae*, oggi classificata come Lattococcosi, è stata segnalata nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in diversi paesi del mondo: Giappone (Hoshina *et al.*, 1956), Sud Africa (Bragg & Broere, 1986), Spagna (Barrera & Torturo, 1989; Palacios *et al.*, 1993), Australia (Carson *et al.*, 1993), Taiwan (Chang *et al.*, 2002) e ovviamente anche in Italia fin dal 1991 (Ceschia *et al.*, 1992; Ghittino & Prearo, 1992).

L'agente eziologico della malattia è *L. garvieae* [sinonimo (Eldar *et al.*, 1996) di *Enterococcus seriolicida* (Kusuda *et al.*, 1991)], un cocco Gram positivo, catalasi negativo, che cresce bene in TSA e Agar Sangue da 4° C a 45° C, con formazione di piccole colonie biancastre circondate da un alone di α emolisi, in grado di replicarsi anche a pH 9,6 e al 6,5 % di NaCl (Kusuda & Salati, 1999).

La notevole patogenicità di *L. garvieae* per la trota iridea è stata dimostrata anche recentemente da ricercatori spagnoli che hanno infettato sperimentalmente trote iridee di diversa pezzatura (Muzquiz *et al.*, 1999; Vendrell *et al.*, 2004) con circa 10^4 cellule/pesce, ottenendo nel giro di pochi giorni mortalità superiori al 70%.

Attualmente, invece, sono ancora piuttosto rare le pubblicazioni relative alle caratteristiche di resistenza nell'ambiente e nell'ospite target, la trota iridea, di questo insidioso patogeno. Barnes *et al.*, (2002) oltre a confermare la netta distinzione da un punto di vista sia eziopatogenetico che immunologico dei ceppi con capsula, molto virulenti e immunogeni, da quelli privi di capsula, scarsamente patogeni e in grado di evocare una ridotta risposta anticorpale, hanno ipotizzato che tale differenza sia legata anche alle diverse capacità difensive degli anticorpi umorali circolanti.

I ceppi capsulati, infatti, risultano resistenti alle difese insite sia nel siero normale che nel siero di animali immunizzati, confermando le potenzialità patogene di questo cocco Gram positivo.

Chang *et al.*, (2002) hanno compiuto degli studi relativamente alle caratteristiche biochimiche e di resistenza al trattamento termico di 5 ceppi isolati dal primo focolaio di

Lattococcosi dell'isola di Taiwan, dimostrando che crescono sia a 45° C che a 65° C (com. pers., 2004).

Questo secondo dato sembra in contrasto con quanto riportato nei principali testi di malattie batteriche dei pesci (Austin & Austin, 1999; Kusuda & Salati, 1999), in cui si evidenzia come *L. garvieae* (già *E. seriolicida*) cresce bene a 44-45° C, ma non a 50° C o a temperature maggiori.

Durante la nostra indagine, invece, il 100% dei ceppi è ricresciuto nonostante il trattamento termico a 50° C, indipendentemente dal tempo di esposizione (5, 10, 20 e 30 minuti) e a 60° C si è avuta ricrescita nel 100%, 47,5%, 60% e 37,5% dei casi rispettivamente dopo 5', 10, 20' e 30' di trattamento con il calore.

I 3 ceppi percentualmente più resistenti, inoltre, sono cresciuti anche dopo trattamento termico a 70° C per 10 minuti (Grafico 2). La reincubazione a 4° C e 37° C per 24-48 ore aveva lo scopo di simulare nel primo caso la conservazione della trota in cella frigorifero, mentre nel secondo caso di riprodurre cattive condizioni di conservazione del prodotto, favorendo al contrario il massimo sviluppo del ceppo batterico.

Questa elevata resistenza al calore di *L. garvieae* offre alcuni interessanti spunti di riflessione, in quanto in letteratura esistono alcune segnalazioni, fortunatamente sporadiche, di episodi nell'uomo: infezioni del tratto urinario (Elliott *et al.*, 1991), endocarditi ed osteomieliti (Fefer *et al.*, 1998; James *et al.*, 2000) e formazione di ascessi epatici (Mofredj *et al.*, 2000) in pazienti immunocompromessi. Nonostante Fefer *et al.* (1998) considerino sottostimate le segnalazioni di infezione umana riconducibili a *Lactococcus garvieae*, a causa della sua notevole somiglianza fenotipica con altri enterococchi, fortunatamente non esistono segnalazioni di contagio tra gli allevatori, gli addetti agli impianti di trasformazione, né tantomeno tra i consumatori di prodotti ittici. La scarsa patogenicità per i mammiferi sembrerebbe essere confermata anche dalle nostre prove preliminari effettuate su topini, in quanto nessuno dei 27 animali inoculati con i ceppi batterici o con il surnatante ha manifestato sintomi o è morto. Relativamente alla diffusione della malattia, invece, la via alimentare sembra attualmente da escludere, in quanto la maggior parte dei pesci viene alimentata con mangimi pellettati o estrusi che solitamente nelle fasi di produzione raggiungono temperature piuttosto elevate. Tuttavia la notevole resistenza nell'ambiente (a temperature tra i 4 e i 70° C, pH 4,5-9,6, salinità 0-6,5‰) di tale microrganismo potrebbe spiegare l'elevata incidenza della malattia nella trota coltura nazionale. L'aumento della temperatura media ambientale (global warming) sicuramente ne sta favorendo lo sviluppo in quanto la trota, animale tipicamente d'acqua fredda, oltre i 16-17° C esce da quello che viene definito come range ottimale per la sua crescita (Giordani & Melotti, 1984) e ciò induce condizioni stressanti che possono favorire l'insorgenza della malattia. Tuttavia recentemente sono in aumento le segnalazioni di episodi verificatisi a basse temperature (12-13° C) e con acqua di pozzo, ad ulteriore conferma di quanto insidioso possa essere questo lattococco. Un ultimo aspetto che sarebbe interessante valutare nell'immediato futuro riguarda l'origine della Lattococcosi, ma per condurre un'accurata indagine epidemiologica retrospettiva, possibile oggi con le moderne tecniche di biologia molecolare, bisognerebbe effettuare tale studio sui ceppi di enterococchi isolati prima del 1991 dalle diverse specie animali, uomo compreso, in analogia a quanto effettuato da Vela *et al.* (2000). Gli autori spagnoli non avrebbero trovato alcuna relazione tra i ceppi isolati dalla trota e quelli provenienti da focolai di mastite subclinica di vacche da latte e bufale, né alcun rapporto con i ceppi isolati dall'uomo. Un'indagine di questo tipo, purtroppo, sembra essere ostacolata dalla difficoltà di reperire tali ceppi di campo, in conseguenza del fatto che solitamente, sia in campo medico che veterinario, i diversi laboratori si limitano alla diagnosi di streptococchi o enterococchi fecali, ritenuti generalmente scarsamente patogeni.

BIBLIOGRAFIA

Austin B. & Austin D.A. (1999). Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. *Springer Praxis Publishing, Chichester, U.K.*

Barnes A.C., Guyot C., Bjarne Hansen G., Mackenzie K., Horne M.T. & Ellis A.E. (2002). Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulated and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 12: 155-168.

Barrera J. & Tortuero E. (1989). Non haemolytic *Streptococcus sp.*: outbreak in rainbow trout in Spain. *Proceedings of European Association of Fish Pathologists, IV International Conference, Santiago de Compostela*: 83.

Bragg R.R & Brocre J.S.E. (1986). Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 6: 89-91.

Carson J., Gudkovs N & Austin B. (1993). Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Dis.*, 16: 381-388.

Chang P.H., Lin C.W. & Lee Y.C. (2002) *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22, 5: 319-327.

Ceschia G., Giorgetti G., Giavenni R. & Sarti M. (1992). A new problem for Italian trout farms: streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 12: 71-72.

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 meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, 32: 85-88.

Eldar A., Gorla M., Ghittino M., Zlotkin A. & Bercovier H. (1999). Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3: 1005-1008.

Elliott J.A., Collins M.D., Pigott N.E. & Facklam R.R. (1991). Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 2731-2734.

Fefer J.J., Ratzan K.R., Sharp S.E. & Saiz E. (1998). *Lactococcus* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 32, 2: 127-130.

Ghittino C. & Prearo M. (1992). Segnalazione di Streptococcosi nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Italia: nota preliminare. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica*, 8: 4-11.

Ghittino C., Prearo M., Ghittino M. & Eldar A. (1998). Recenti acquisizioni sulle "Streptococcosi" d'acqua calda nella trota iridea. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica*, 23: 43-50.

Ghittino C. Prearo M., Latini M., Agnetti F., Accornero P., Cabra S. & Eldar A. (2002). Studi sulla vaccinazione contro la Lattococcosi nei salmonidi. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica*, 33: 18-29

Giordani G. & Melotti P. (1984) Elementi di acquacoltura. *Edagricole, Bologna*.

- Hoshina T. (1956). An epidemic disease affecting trout in Japan. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 42: 35-46.
- James P.R., Hardman S.M. & Patterson D.L. (2000). Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae* : a first case report. *Postgraduate-medical-journal*, 76 (895): 301-303.
- Kusuda K., Kawai K., Salati F., Banner C.R. & Freyer 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, Vol. 3 Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Eds. Woo P.T.K. and Bruno D.W.: 303-318.
- Manfrin A., Franceschini F., Qualtieri K., Rampazzo E., Volpin M., Selli L. & Bovo G. (2003). Isolamento di *Lactococcus garvieae* da trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in fase di pre-macellazione: risultati preliminari e risvolti di sanità pubblica. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 37: 2-12.
- Mofredj A., Baraka D., Cadranel J.F., Le Maitre P., Kloeti P. & Dumont J.L. (2000). *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immunosuppressed patient. *Am. J. Med.*, 109, 6: 513-514.
- Muzquiz J.L., Royo F.M., Ortega C., De Blas I., Ruiz I. & Alonso J.L. (1999). Pathogenicity of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19, 3: 114-119.
- Palacios M.A., Zamora M.J., Velazquez J., Zamora E. & Duran A. (1993). Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica*, 13: 11-14
- Vela A.I., Vazquez J., Gibello A., Bianco M.M., Moreno M.A., Liebana P., Albendea C., Alcalà B., Mendez A., Dominguez L. & Fernandez Garayzabal J.F. (2000). Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from Lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. *J. Clin. Microbiol.*, October: 3791-3795.
- Vendrell D., Balcazar J.L., Ruiz-Zarzuola I., De Blas I., Girones O. & Muzquiz J.L. (2004). Evaluation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of Ichtiovac-LG, a vaccine against *Lactococcus garvieae*. *Book of Abstracts 6th Intern. Symposium on Fish Immunology, Turku*: 45.