

Beta-haemolytic streptococci in farmed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, from Sullana-Piura, Peru

Estreptococos beta-hemolítico en tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en Sullana, Piura - Perú

Yessica Ortega A¹ MV, Frank Barreiro S² Tec Acui, Gina Castro S¹ MV, Karina Huancaré P¹ MV, Alberto Manchego S¹ M.Sc, Marco AA Belo^{3,4} Ph.D, Mayra AP Figueiredo⁵ Ph.D, Wilson G Manrique³ Ph.D, Nieves Sandoval Ch^{1*} M.Sc.

¹National University of San Marcos, School of Veterinary Medicine, Department of Ictiopathology, Av. Circunvalacion 2800, San Borja-Lima, Peru, ²Surcolombiana University, Laboratory of Genomic Medicine, St. 9 N° 14-03 Barrio Altico, Neiva-Huila, Colombia, ³Brazil University - Descalvado Campus. Department of Veterinary Pathology, Av. Hilário da Silva Passos, 950 – Parque Universitário Descalvado, CEP: 13690-970, São Paulo - Brazil. ⁴São Paulo State University, Department of Preventive Veterinary Medicine, Via de Acesso Paulo Donato Castellane, S/N, CEP 14.884-900, Jaboticabal/SP – Brazil. ⁵University of São Paulo, Department of Clinical Analysis, Toxicology and Food Scienc, Laboratory of Virology, Bloco S, 1º Andar, Av. do Café, s/n - CEP: 14040-903 – Ribeirão Preto, Brazil. *Correspondence: nieves.sandovalchaup@gmail.com

Received: December 2015; Accepted: August 2016.

ABSTRACT

Objective. This investigation aimed to study the presence of *Streptococcus* spp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) from fish farm located in Sullana-Piura, Peru. **Materials and methods.** 150 fish with clinical signs of streptococcal disease were sampled, and the bacterium isolation was performed on blood agar, correlated to histopathological lesions description and molecular confirmation by real-time PCR. **Results.** The necropsy revealed exophthalmia, hyphema, congestion and/or haemorrhagic meninges, ascites, splenomegaly, hepatomegaly and diffuse haemorrhagic zones throughout the body. 102 isolated positives (54 tilapias) to *Streptococcus* spp. were identified in the microbiological analysis (prevalence of 26%), the brain was the organ with the highest percentage of this bacteria (34.31%), and 19 isolates were beta-haemolytic (18.63%) with prevalence of 10.12%. Fish beta-haemolytic streptococci presented epicarditis, perisplenitis and chronic meningitis, panophthalmitis, coagulative necrosis of skeletal muscle and granulomas formation. In the confirmatory test by real-time PCR, any positive tilapia to *S. iniae* was obtained. The results were analysed using a stochastic simulation of beta distribution using @Risk program uncertainty, reporting an average prevalence of 0.66% in sick tilapias. **Conclusions.** The analysed fishes were positive to bacteria of the genus *Streptococcus*, which confirms its presence in the fish farm. However, 19 isolates were beta-haemolytic, and the presence of *S. iniae* was not positive to the limit prevalence of 2.7% in real-time PCR.

Keywords: Cichlids, histopathology, microbiology, PCR, teleost fish (Source: DeCS, CAB, MeSH).

RESUMEN

Objetivo. Esta investigación objetivó estudiar la presencia de *Streptococcus* spp. en tilapia (*Oreochromis niloticus*) de la piscifactoría localizada en Sullana-Piura, Perú. **Materiales y Métodos.** 150 peces con signos clínicos de la enfermedad estreptocócica fueron analizados, el aislamiento bacteriano se realizó en agar sangre, en correlación con las lesiones histopatológicas y diagnóstico molecular mediante PCR en tiempo real. **Resultados.** A la necropsia se observó exoftalmia, hifema, congestión y/o meninges hemorrágicas, ascitis, esplenomegalia, hepatomegalia y zonas hemorrágicas difusas en todo el cuerpo. 102 aislados positivos (54) tilapias para *Streptococcus* spp. fueron identificados en el análisis microbiológico (prevalencia del 26%), el cerebro fue el órgano con el más alto porcentaje del género de esta bacteria (34.31%), 19 aislados fueron beta-hemolítico (18.63%), con prevalencia de 10.12%. Peces con *Streptococcus* beta-hemolíticos presentaron epicarditis, perisplenitis y meningitis crónica, panofalmitis, necrosis coagulativa del músculo esquelético y formación de granulomas. En el análisis de PCR en tiempo real, no se obtuvo ninguna tilapia positiva para *S. iniae*. Los resultados se analizaron mediante una simulación estocástica de la distribución beta usando el programa de incertidumbre @Risk, reportando una prevalencia media de 0.66% en tilapias enfermas. **Conclusiones.** Los peces analizados fueron positivos para bacterias del género *Streptococcus*, lo que confirma su presencia en la piscifactoría. Sin embargo, 19 aislados fueron beta-hemolíticos, y la presencia de *S. iniae* no fue positiva para la prevalencia límite de 2.7% en PCR en tiempo real.

Palabras clave: Cíclidos, histopatología, microbiología, PCR, pez teleosteo (Fuentes: DeCS, CAB, MeSH).

INTRODUCTION

In South America, tilapia production has grown in the last decades (1). The cichlids present notably characteristics for production, such as rapid growth, tolerance to a wide range of environmental conditions, available for eating a variety of foods, white meat and relatively low production costs (2,3).

The intensification of tilapia production and high stocking densities are favourable conditions to spread diseases (4); and that induce inflammatory process, dramatically compromising the immune response (5,6) ending with the death of the animal. Currently several epizooties that affect them, usually caused by bacterial agents are known (2). The Streptococcal infections have become a major problem in tilapia production, generating high morbidity and/or mortality, and severe economic losses in different fish farms in the world (3,7).

Streptococcus agalactiae and *Streptococcus iniae* are the main bacterial species that affect production of tilapia in the world (8). However, some authors mention that the *S. iniae* is more distributed, affecting a larger number of fish species than *S. agalactiae* (9). *S. iniae* causes high rates of mortality, which varies between 30-50% (9). Also, this agent causes changes in fillets, which are inappropriate for trade (2). In addition, it has been reported that *S. iniae* is a zoonotic pathogen (10).

INTRODUCCIÓN

En América del Sur, la producción de tilapias ha crecido en las últimas décadas (1). Estos ciclídeos presentan características notables de producción, como rápido crecimiento, tolerancia a amplios rangos de condiciones ambientales, disponibilidad en comer gran variedad de alimentos, producción de carne blanca y relativo bajo costo de producción (2,3).

La intensificación de la producción de tilapia y altas densidades, son condiciones favorables para la diseminación de enfermedades (4); que inducen procesos inflamatorios, comprometiendo la respuesta inmune (5,6) que termina con la muerte del animal. Actualmente se conocen varias epizootias que afectan los peces, generalmente causadas por agentes bacterianos (2). Las infecciones estreptocócicas se han convertido en un problema importante en la producción de tilapia, lo que genera alta morbilidad y/o mortalidad, y graves pérdidas económicas en diferentes piscifactorías en el mundo (3,7).

Streptococcus agalactiae y *Streptococcus iniae* son las principales especies bacterianas que afectan la producción de tilapia en el mundo (8). Sin embargo, algunos autores mencionan que *S. iniae* está más distribuido y afecta mayor número de especies de peces que *S. agalactiae* (9). *S. iniae* provoca altos índices de mortalidad, que oscila entre el 30-50% (9). Además, este agente provoca cambios en filetes, que son inapropiadas para el comercio (2). En adición, se ha informado que *S. iniae* es un patógeno zoonótico (10).

In Peru, the tilapia production is a promising activity. However, there is a lack of identification and knowledge of bacterial diseases that affect this culture and could impair its production (11). Previous studies reported the existence of clinical signs and lesions consistent with *Streptococcus* spp. (12).

The aim of this study was to determine if *S. iniae* is present in an intensive fish farm of *Oreochromis niloticus* located in Sullana-Piura, Peru.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design. 150 tilapias were collected 75 of the phases nursery (33.5±3.6 g) and 75 grow-out (670.5±22.6 g) from ponds with clinical signs such as shallow and erratic swimming, exophthalmia and haemorrhagic skin lesions. The animals were euthanized with a lethal dose of sodium benzocaine 1:500 (v/v) previously diluted in alcohol 98° (0.1 g/mL) (13).

Location. The fish were sampled from an intensive fish farm located in the Lancones district, Sullana province, Piura department, to Peru north-western (4 ° 38'27 "S 80 ° 32'55" W). The water surface area is 19.26 hectares (Ha) and is supplied by the Poechos reserve. Flow areas and the fish farm are: reproductive reception, reproduction, breeding 1, breeding 2, growth, nursery, grow-out and harvest.

The study was performed between the months of February and June in 2014, with at room temperature between 24°C - 35°C. Also, the averages of the physico-chemical parameters of the water recorded for the fish farm (using a multiprobe system, model YSI-556) were:

Nursery: T°: 25.3±1.8 °C, Dissolved oxygen (DO): 5.3±0.6 mg/L, CO₂: 4.1±0.9 mg/L, pH: 7.3±0.6, nitrite: 0.008±0.003 mg/L, ammonium: 0.14± 0.02 mg/L, alkalinity: 92.07±2.6 mg/L, hardness: 92.5 ±3.2 mg/L.

Grow-out: T°: 25.1±2.2 °C, Dissolved oxygen (DO): 3.99 ±0.9 mg/L, CO₂: 2.93 ±0.4 mg/L, pH: 5.7±0.4, nitrite: 0 mg/L, ammonium: 0.34±0.12 mg/L, alkalinity: 98.84±3.1 mg/L, hardness: 93.2±2.8 mg/L.

Sample size. To determine the sample size was used the limit prevalence formula for detection of a disease. The use of this formula means that there is a probability of the 95% to find at least one positive, if the prevalence is equal or greater than the limit prevalence (2.7%). Consequently, the absence of positive indicates that the disease

En Perú, el cultivo de la tilapia es una actividad promisoriosa. Sin embargo, la falta de identificación y el conocimiento indicado para diagnosticar las enfermedades bacterianas que afectan este cultivo podría perjudicar su producción (11). Previos estudios reportaron la existencia de signos clínicos y lesiones compatibles con *Streptococcus* spp. (12).

El objetivo de este estudio fue determinar si *S. iniae* está presente en una piscifactoría intensiva de *Oreochromis niloticus* situada en Sullana-Piura, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental. 150 tilapias fueron colectadas, 75 en la fase de pre engorde (33.5±3.6 g) y 75 en la fase de engorde (670.5±22.6 g); de pozas, con signos clínicos como: nado superficial y errático, exoftalmia y lesiones hemorrágicas en piel. Los animales fueron sacrificados con una dosis letal de benzocaína sódica 1:500 (v/v), previamente diluido en alcohol 98° (0.1 g/mL) (13) y se procedió a la necropsia.

Localización. Las tilapias fueron muestreadas de una piscigranja de crianza intensiva ubicada en el distrito de Lancones, provincia de Sullana, departamento de Piura, zona nor-occidental del Perú (4°38'27"S, 80°32'55"O). El espejo de agua de la zona es 19.26 hectáreas (Ha) y es abastecida por la represa de Poechos. Las áreas y flujo de la piscigranja son: Recepción de reproductores, reproducción, alevinaje 1, alevinaje 2, crecimiento, pre-engorde, engorde y cosecha.

El estudio fue realizado entre los meses de Febrero y Junio del 2014, en este periodo la temperatura ambiental osciló entre los 24°C - 35°C. Así mismo, el promedio de los parámetros físico-químicos del agua registrados por la piscigranja (usando un sistema multisonda, modelo YSI-556) fueron:

Pre engorde: T°: 25.3±1.8 °C, Oxígeno disuelto (OD): 5.3±0.6 mg/L, CO₂: 4.1±0.9 mg/L, pH: 7.3±0.6, nitritos: 0.008±0.003 mg/L, amonio: 0.14± 0.02 mg/L, alcalinidad: 92.07±2.6 mg/L y dureza: 92.5 ±3.2 mg/L.

Engorde: T°: 25.1±2.2 °C, Oxígeno disuelto (OD): 3.99 ±0.9 mg/L, CO₂: 2.93 ±0.4 mg/L, pH: 5.7±0.4, nitritos: 0 mg/L, amonio: 0.34±0.12 mg/L, alcalinidad: 98.84±3.1 mg/L y dureza: 93.2±2.8.

Tamaño muestral. Para determinar el tamaño muestral se utilizó la fórmula de prevalencia límite para la detección de una enfermedad. El uso de esta fórmula implica que existe una probabilidad

to be present, its prevalence would be less than the limit prevalence.

Ethical aspects. The research was approved by the Committee of Ethics and Animal Welfare – CEAW (CEBA2005-009), School of Veterinary Medicine of the National University of San Marcos, according to compliance with international principles and laws as outlined by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Microbiology. Aseptic court of the indicated organs (spleen, brain, liver, and head kidney) was performed and the sterile swab from Stuart transport medium (Deltalab, SLU, Spain) was introduced. The swab samples were seeded in blood agar plates (supplemented with 5% sheep blood) and incubated at 30°C for 24-48 hours.

Colonies were selected that showed characteristics of Gram positive cocci, small colonies white, translucent or pigmented, slightly convex, up to 2 µm in diameter, with negative testing for catalase, oxidase and motility some haemolysis, glucose (Neogen Acumedia, USA), lactose (Sigma, USA), maltose (Sigma, USA), mannitol (Merck, Germany), indole and H₂S production. In addition, were considered the following tests to differentiate the species *S. iniae*: acetoin production (Voges Proskauer) (Remel, USA), aminopeptidase leucine (LAP) (Remel, USA), arylamidase pyrrolidonyl (PYR) (Remel, USA), starch hydrolysis (Merck, Germany) and esculin hydrolysis (Neogen, Acumedia, USA). The protocol for the tests mentioned followed the manufacturer's recommendations.

Histopathology. Tissues cutting about 1.0 cm diameter were fixed in 10% buffered formalin solution. Samples of spleen, gills, brain, cecum, heart, stomach, liver, intestine, skeletal muscle, skin and head kidney were processed according to the standard protocol for histological studies of fixed tissues. Cross-sections with thickness of 5 µm were fixed and stained with hematoxylin-eosin.

Molecular Biology.

DNA extraction. The DNA extraction was performed from pools of organs of each fish of the presumptively positive of *S. iniae* by biochemistry, with the commercial kit PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA), following the manufacturer's instructions for Gram positive bacteria. For DNA purification step centrifugation at 13,000 x g was performed for 1 minute followed by two washes with the elution buffer, using 40 µL each wash. DNA concentration and absorbance ratio (260/280 nm) were measured

del 95% que se encuentre al menos un positivo de ser el caso que la prevalencia sea igual o mayor que la prevalencia límite (2.7%). Consecuentemente, la ausencia de positivos podría indicar la presencia de la enfermedad, pero su prevalencia sería menor de que la prevalencia límite.

Aspectos éticos. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, acorde al cumplimiento de los principios y leyes internacionales como los señalados por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Microbiología. Se realizó un corte aséptico de los órganos indicados (bazo, cerebro, hígado y riñón anterior) y se introdujo el hisopo estéril del medio de transporte Stuart (Deltalab, S.L.U., España). El hisopado de las fueron sembradas por agotamiento en placas con agar sangre (enriquecidas con 5% de sangre de ovino), e incubadas a 30°C por 24-48 horas.

Fueron seleccionadas las colonias que presentaron características de cocos Gram positivos, colonias pequeñas blancas, translúcidas o pigmentadas, ligeramente convexas, de hasta 2 µm de diámetro, con pruebas negativas para catalasa, oxidasa, motilidad y algún tipo de hemólisis, glucosa (Neogen Acumedia, Estados Unidos), lactosa (Sigma, Estados Unidos), maltosa (Sigma, Estados Unidos), manitol (Merck, Alemania), indol y producción de H₂S. En adición, fueron consideradas las siguientes pruebas para diferenciar a la especie *S. iniae*: Producción de acetoina (Voges Proskauer) (Remel, Estados Unidos), leucina-aminopeptidasa (LAP) (Remel, Estados Unidos), pirrolidoniil arilamidasa (PYR) (Remel, Estados Unidos), hidrólisis de almidón (Merck, Alemania) e hidrólisis de esculina (Neogen, Acumedia, Estados Unidos). El protocolo para realizar las pruebas mencionadas fueron los descritos por el fabricante.

Histopatología. Se realizó el corte de tejidos de aproximadamente 1 cm de diámetro y fueron fijadas en solución de formalina bufferada al 10%. Las muestras de bazo, branquias, cerebro, ciego, corazón, estómago, hígado, intestino, músculo esquelético, piel y riñón cefálico fueron procesadas de acuerdo con el protocolo convencional para estudios histológicos de tejidos fijados. Se realizaron secciones de corte de 5 µm de grosor, fueron fijadas en láminas y coloreadas con hematoxilina-eosina (HE).

Biología Molecular.

Extracción de ADN. La extracción de ADN fue realizada a partir de colonias aisladas de los

using a spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Finally, the genetic material stored at -20°C until use.

Controls. The strains used as positive controls were *S. iniae* ATCC 29178 donated by the Laboratory of Genomic Medicine of the Surcolombiana University and the *S. iniae* ATCC 29177 (MicroBioLogics, USA). Both extracted with the commercial kit PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA). Furthermore, water DEPC (Invitrogen, USA) was used as negative control.

Qualitative real-time PCR. The primers and probe used for the detection of *S. iniae* were forward 5'GTTTTCTTGAAGCTATTGCAGGTT T3', reverse 5'CGCGCAAGGGTTTCATG3' and probe 5'VIC- CTGCGGTTGCCATACCAGCAAGTATTCTA-TAMRA3'. These primers and probe were synthesized from the sequence No. Y07622.1 lactate oxidase protein (*lctO*) using the Primer Express 3.0 Applied Biosystems Software (Life Technologies, USA). PCR was performed in duplicate, in short: 12.5 μL of Taqman Universal PCR Master Mix (2x) (Invitrogen, USA), 0.5 μL of probe (10 μM) (Bioneer Corporation, Corea), 1.25 μL of primer F (10 μM), 1.25 μL of primer R (10 μM), 1 μL of DNA (20 ng/ μL), 8.5 μL of DEPC water (Invitrogen) to a total volume of 25 μL .

Thermal conditions used were: denaturation at 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C , 2 minutes annealing at 50°C and 1 minute of extension at 60°C using the equipment Applied Biosystems 7500 (Life Technologies, USA).

Data analysis. The calculation of the prevalence of positive to *Streptococcus* spp. tilapia was conducted. For microbiological characterization and tilapia *S. iniae* alleged positive by biochemical, by @Risk (Palisade Corp) uncertainty program implemented in Excel[®] spreadsheet (Microsoft Corp).

For the calculation of the prevalence of *S. iniae* in sick animals or with clinical signs was developed a stochastic simulation using beta distribution program @Risk Uncertainty (Palisade Corp) implemented in a spreadsheet Excel[®] (Microsoft Corp.). Briefly, the probability of infection in apparently sick fishes and their intervals were calculated using a Beta distribution with parameters α and β where:

$$\alpha = \text{positivos} + 1 \text{ and } \beta = \text{negativos} + 1$$

Confidence intervals were calculated running the simulation 30.000 interactions.

órganos de cada pez presuntamente positivos para *S. iniae* por la bioquímica, con el kit comercial de PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante para bacterias Gram positivas. Para el paso de purificación de ADN se realizó la centrifugación a $13000 \times g$ por 1 minuto seguido de dos lavados con el buffer de elusión, utilizando 40 μL en cada lavado. La concentración de ADN y la razón de absorbancias (260/280 nm) fueron medidos usando un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Finalmente el material genético fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Controles. Las cepas utilizadas como controles positivos fueron *S. iniae* ATCC 29178, donada por el Laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Surcolombiana y *S. iniae* ATCC 29177 (Microbiologics, Estados Unidos). Ambas extraídas con el kit comercial de PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, Estados Unidos). Por otro lado, se utilizó agua DEPC (Invitrogen, Estados Unidos) como control negativo.

PCR cualitativo en tiempo real. Los primers y sonda utilizados fueron para la detección de *S. iniae* fueron Forward 5'GTTTTCTTGAAGCTATTGCAGGTTT3', Reverse 5'CGCGCAAGGGTTTCATG3' y sonda 5'VIC-CTGCGGTTGCCATACCAGCAAGTATTCTA-TAMRA3'. Estos primers y sonda fueron sintetizados a partir de la secuencia de nucleótidos de los genes *lctP* y *lctO* de *S. iniae* (n° de acceso Y07622 en Genbank), utilizando el software Primer Express 3.0 Applied Biosystems (Life Technologies, Estados Unidos). La PCR se realizó por duplicado, resumidamente: 12.5 μL de Taqman Universal PCR master mix (2x) (Invitrogen, Estados Unidos), 0,5 μL de sonda (10 μM) (Bioneer Corporation, Corea), 1,25 μL de cada primer (10 μM), 1 μL de ADN (20 ng/ μL), 8,5 μL agua DEPC (Invitrogen) para un volumen total de 25 μL .

Las condiciones térmicas utilizadas fueron : desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C , 2 minutos de hibridación a 50°C y 1 minuto de extensión a 60°C utilizando el equipo Applied Biosystems 7500 (Life Technologies, Estados Unidos).

Análisis de los datos. Se realizó el cálculo de la prevalencia de tilapias positivas a *Streptococcus* spp., por caracterización microbiológica y las tilapias presuntas positivas a *S. iniae* por bioquímica, mediante el programa incertidumbre @Risk (Palisade Corp) implementado en una planilla electrónica Excel[®] (Microsoft Corp).

Para el cálculo de la prevalencia de *S. iniae* en animales enfermos o con signos clínicos

RESULTS

Necropsy. The *post-mortem* findings evidenced pathological changes such as exophthalmia, ocular opacity, congestion of meninges, ascites haemorrhagic lesions in different zones of the body, bleeding anal pore, splenomegaly, hepatomegaly and necrotic zones on the skeletal muscle (Figure 1a-e).

Microbiology. 102 positive isolates were identified as *Streptococcus* spp. The distribution of these isolates by organ were: liver (18) 17.65%, head kidney (22) 21.57%, spleen (27) 26.47% and brain (35) 34.31%. These isolates corresponded to a total of 54 positive tilapia to *Streptococcus* spp.

From 102 isolates were selected (n=19, 18.63%) only those with β -haemolytic, characteristic of *S. iniae*. These isolates belong to a total of 16 tilapias. The table 1 shows the biochemical profile of these isolates.

The average prevalence of positive tilapia to *Streptococcus* spp., by microbiological characterization was 26% (21% - 33%). Whereas, the average prevalence of positive presumed tilapias to *S. iniae* by biochemical profile was 10.12% (6% - 15.10%).

se desarrolló una simulación estocástica de la distribución beta empleando el programa de incertidumbre @Risk (Palisade Corp) implementado en una planilla electrónica Excel® (Microsoft Corp). Brevemente, la probabilidad de infección en los peces aparentemente enfermos y sus intervalos se calcularon empleando una distribución Beta con parámetros α y β donde:

$$\alpha = \text{positivos} + 1 \text{ y } \beta = \text{negativos} + 1$$

Los intervalos de confianza se calcularon corriendo la simulación por 30.000 interacciones.

Table 1. Biochemical profile and microbiological characteristics from 19 isolates of *Streptococcus* spp. of *Oreochromis niloticus* from fish farm in Sullana-Piura, Peru.

Characteristics	Isolated	%
β -Haemolysis	19	100%
CAMP	19	100%
Starch hydrolysis	13	68.42%
Voges-Proskauer	10	52.63%
LAP	14	73.68%
Mannitol	11	57.89%
Maltose	16	84.21%
Esculin	11	57.89%
PYR	3	0.16%
Glucose	18	94.73%
Lactose	14	73.68%
Indole	9	47.37%
H ₂ S	17	89.47%

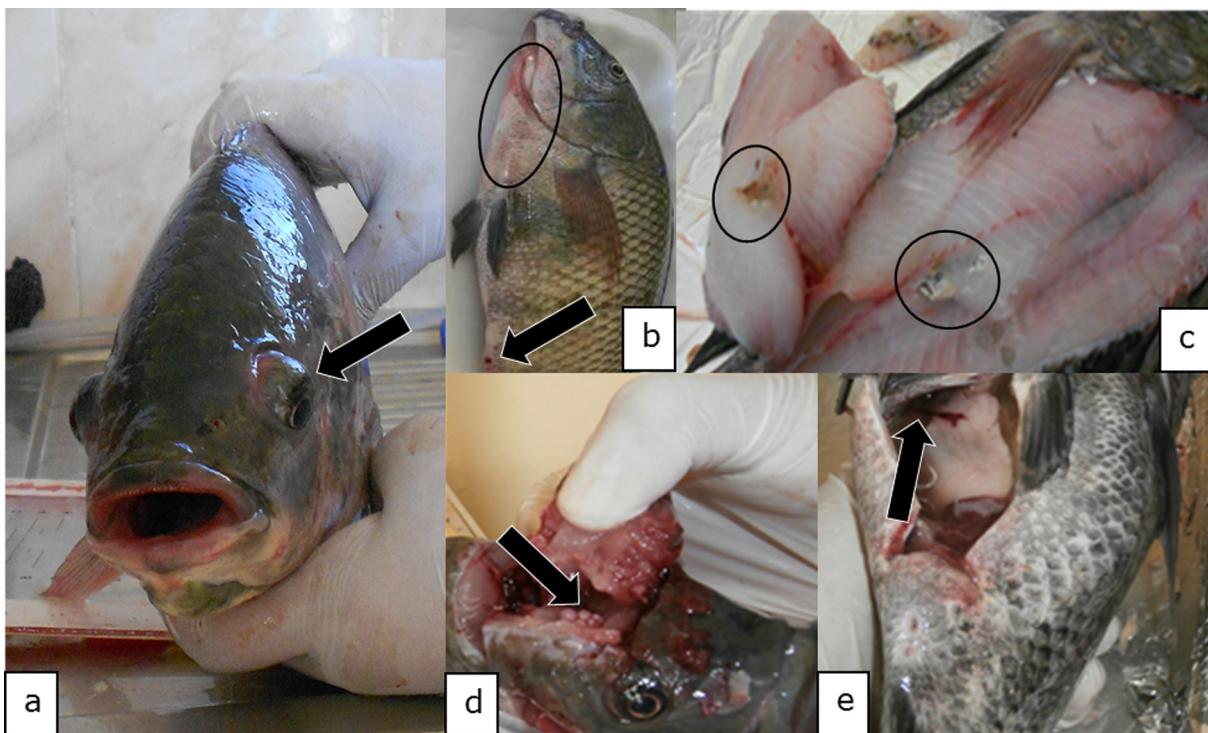


Figure 1 Macroscopic findings compatible with *Streptococcus* spp. in *Oreochromis niloticus*. **a)** Exophthalmia (arrow). **b)** Haemorrhagic lesions on skin (circle) and bleeding anal pore (arrow). **c)** Necrotic lesions on skeletal muscle (circle). **d)** Congestion of the brain (arrow). **e)** Ascites (arrow).

Histopathology. To the histopathological reading of the 16 tilapia positive presumed to *S. iniae* was observed:

Spleen: In 12.5% (2/16) of the cuts, the perisplenic area was observed thickened with the presence of inflammatory exudate composed of neutrophils and macrophages on condensed fibrin, and in some cases, the presence of fibroblasts; compatible with a fibrin-suppurative acute or chronic type perisplenitis (Figure 2-a). In 50% (8/16) bacterial nests and areas of necrosis were noted. In addition, other cuts congestion showed 68.75% (11/16) in the depletion 18.75% (3/16) and increased melanomacrophages centres in 43.75% (7/16).

Brain: In 37.5% (6/16) of the cuts acute diffuse suppurative meningitis was observed. While, in 18.75% (3/16) was observed an infiltration of the brain with an exudate composed of neutrophils and macrophages, consistent with meningoencephalitis. In addition, congestion

RESULTADOS

Necropsia. Los hallazgos post-mortem evidenciaron cambios patológicos como exoftalmia, opacidad de los ojos, congestión de meninges, ascitis, lesiones hemorrágicas en diferentes zonas del cuerpo, poro anal hemorrágico, esplenomegalia, hepatomegalia y zonas necróticas sobre el músculo esquelético (Figura 1a-e).

Microbiología. Se identificaron 102 aislados positivos para *Streptococcus* spp. La distribución de estos aislados por órgano fue: en 18 hígados (17.65%), 22 riñones anteriores (21.57%), 27 bazo (26.47%) y 35 cerebros (34.31%). Estos aislados, correspondieron a un total de 54 tilapias positivas para *Streptococcus* spp.

De los 102 aislados (n=19, 18.63%) se seleccionaron sólo los beta-hemolíticos, característico de *S. iniae*, obteniéndose 19 (18.63 %) aislados. Estos aislados correspondieron a un total de 16 tilapias. En la tabla 1 se observa el perfil bioquímico de estos aislados.

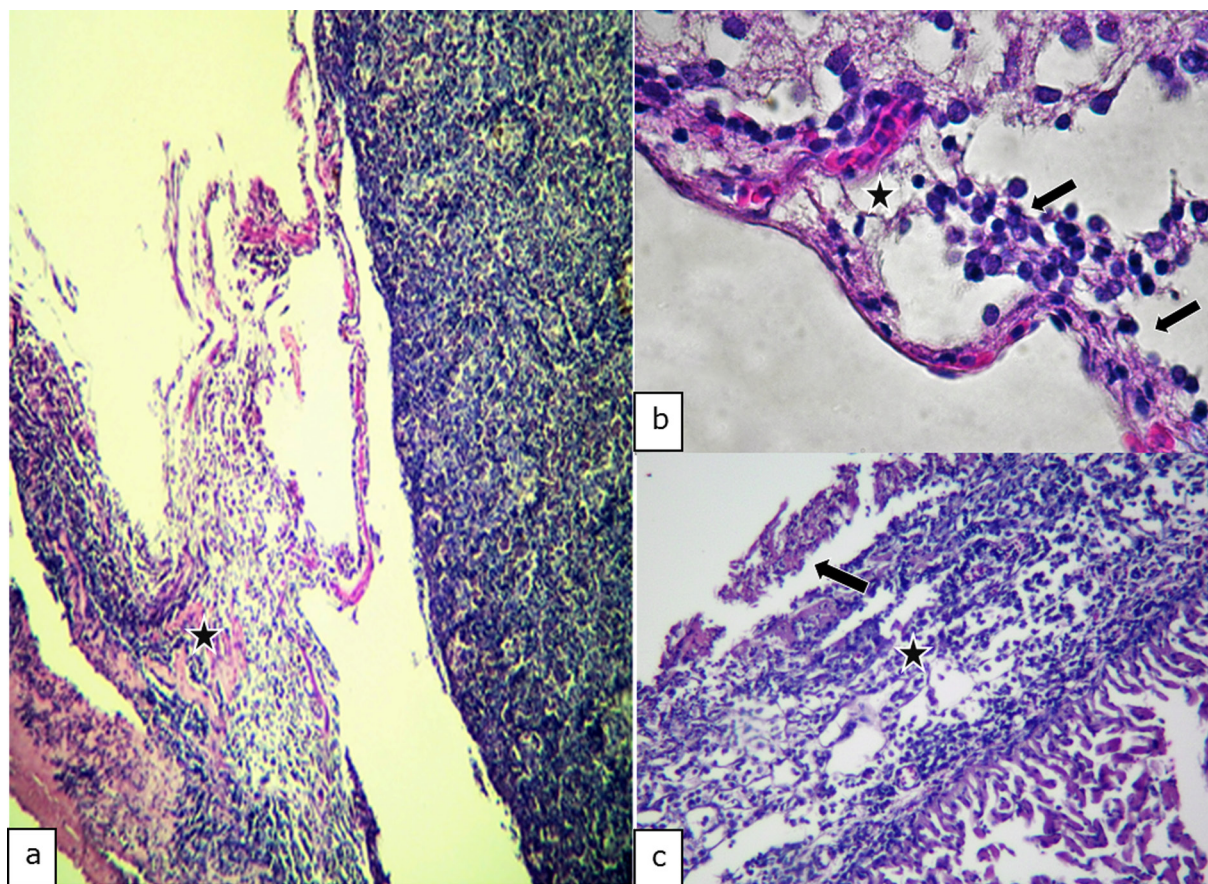


Figure 2. Histopathological findings in *Oreochromis niloticus*. **a)** Photomicrograph of the spleen showing a fibrinosuppurative splenitis (star). **b)** Photomicrograph of the brain showing congestion (star) and mononuclear infiltrate (arrow). **c)** Photomicrograph of the heart showing of the thickened epicardium (star) and mononuclear inflammatory exudate on fibrin deposits (arrow). Hematoxylin-Eosine, Scale bar = 20 μ m.

meninges in 18.75% (3/16) and 6.25% (1/16) for the presence bacterial nests were evidenced (Figure 2-b).

Heart: Severe acute fibrinous suppurative epicarditis was observed and in other cases, chronic type, shown in 56.25% (9/16). In some compact infarction disintegration was observed cardiac muscle fibers, including the presence of inflammatory exudates comprising neutrophils, macrophages, eosinophilic granule cells (ECG) and red blood cells, representing 56.25% (9/16) (Figure 2-c).

Stomach: Suppurative gastritis was evidenced in 18.75% (3/16).

Liver: The thickened perihepatic area was observed with the presence of an inflammatory exudate composed of neutrophils (some or degenerate), macrophages and eosinophilic granule cells seated on fibrin condensed and in other cases, the presence of fibroblasts was demonstrated. These lesions were compatible with a severe acute suppurative fibrin-perihepatitis and in other cases, chronic type, in 37.5% (6/16). A cut to 6.35% (1/16) showed the presence of bacterial nests.

In 12.5% (2/16) of the cuts granulomas, composed by aggregated macrophages which were circumscribed by fibroblasts. Also, the hepatopancreas showed an inflammatory exudate (Figure 3-4) it was evidenced. Moreover, 75% (12/16) of sample fish showed necrosis. While in 56.25% (9/16) steatosis and hydropic degeneration of hepatocytes was evidenced.

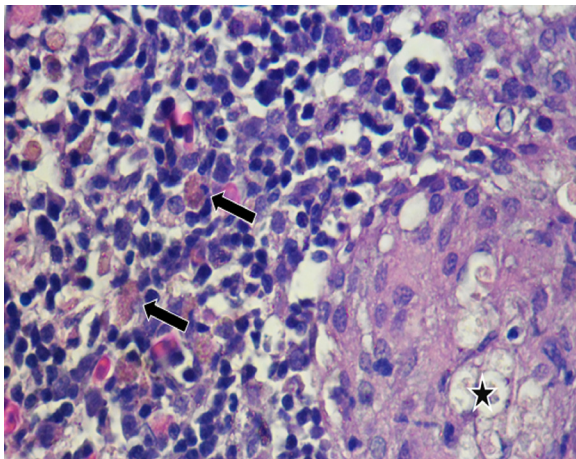


Figure 3. Histopathological findings in *Oreochromis niloticus*. Photomicrograph of the hepatopancreas showing a granuloma with aggregated macrophages (star) and free melanomacrophages (arrows). Hematoxylin-Eosine, Scale bar = 20 μ m.

La prevalencia media de tilapias positivas a *Streptococcus* spp., por caracterización microbiológica fue de 26% (21% - 33%). Mientras que, la prevalencia media de las tilapias presuntas positivas por perfil bioquímico para *S. iniae*., fue de 10.12% (6% - 15.10%).

Histopatología. A la lectura histopatológica de las 16 tilapias presuntas positivas a *S. iniae* se observó:

Bazo: En el 12.5% (2/16) de los cortes, la zona periesplénica se observó engrosada con presencia de exudado inflamatorio compuesto por neutrófilos y macrófagos asentados sobre fibrina condensada, y en algunos casos, la presencia de fibroblastos; compatible con una periesplenitis fibrinosupurativa tipo aguda o crónica (Figura 2-a).

En el 50% (8/16) se observaron nidos bacterianos y zonas de necrosis. Además, otros cortes evidenciaron congestión 68.75% (11/16), depleción en 18.75% (3/16), e incremento de centros de melanomacrófagos en el 43.75% (7/16).

Cerebro: En 37.5% (6/16) de los cortes se observó una meningitis supurativa difusa aguda. Mientras que, en 18.75% (3/16) se observó infiltrado celular con un exudado compuesto por neutrófilos y macrófagos, compatible con una meningoencefalitis. Además de, congestión de las meninges 18.75% (3/16) y en 6.25% (1/16) se evidenció zonas basófilas compatibles con nidos bacterianos (Figura 2-b).

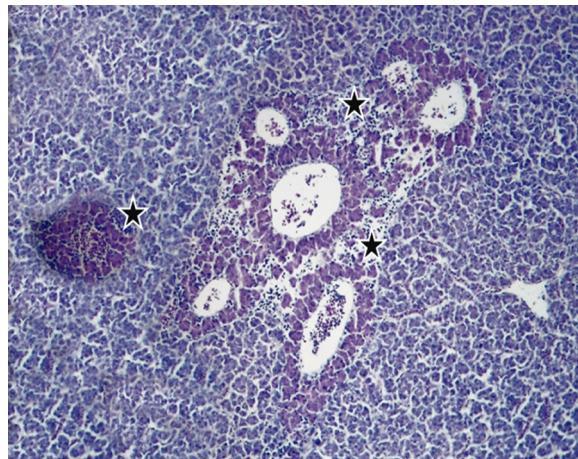


Figure 4. Histopathological findings in *Oreochromis niloticus*. Photomicrograph of the hepatopancreas showing inflammatory exudate around of the hepatopancreas (star). Hematoxylin-Eosine, Scale bar = 20 μ m.

Intestine: Infiltration of the intestinal epithelium, presence of neutrophils, macrophages and melanomacrophages were observed representing 6.25% (1/16) of cases. Serosa macrophage infiltration was also observed at 6.25% (1/16) of cases. Cutting a 6.25% (1/16) plus epithelial hyperplasia and necrosis was observed; compatible with mild to moderate acute diffuse suppurative enteritis.

Skeletal Muscle: Coagulative necrosis was observed representing 56.25% (9/16) of the cases (Figure 5), presence of some inflammatory cells (macrophages, neutrophils and eosinophilic granule cells in 6.25% (1/16) of cases.

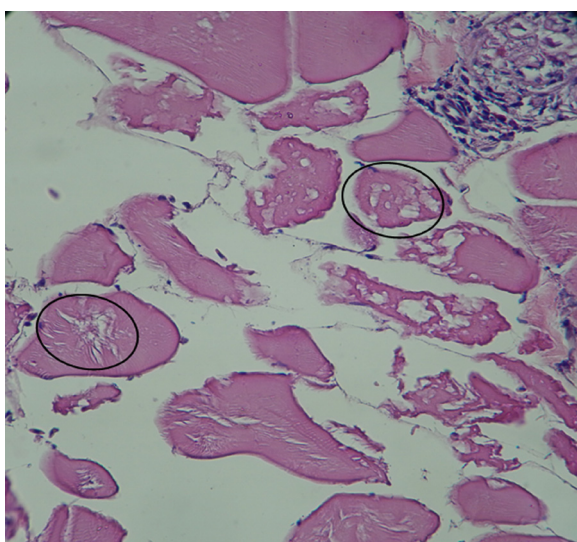


Figure 5. Histopathological findings in *Oreochromis niloticus*. Photomicrograph of the skeletal muscle showing coagulative necrosis (circle). Hematoxylin-Eosine, Scale bar = 20 μ m.

Eyes: The layers of the retina were observed disintegrated, demonstrating a process of oedema in 31.25% (5/16). The corneal epithelium, choroid plexus and adipose tissue were observed severely infiltrated with presence of exudate composed of neutrophils and macrophages (panoftlamitis and panniculitis), compatible with moderate to severe acute suppurative panophthalmitis, representing 81.25% (13/16) of cases (Figure 6).

Thirteen cuts with 81.25% (13/16) showed scattered cells of the retinal pigment epithelium, showing phagocytic activity.

Skin: The skin hydropic degeneration and necrosis with loss of epithelium was observed in a cut representing 6.25% (1/16). Furthermore, the dermis and infiltration of debris exudate

Corazón: Se observó severa epicarditis fibrinosupurativa aguda y en otros casos, de tipo crónica, evidenciado en el 56.25% (9/16). En el miocardio compacto se observó disgregación de algunas fibras musculares cardíacas, y entre ellas la presencia de un exudado inflamatorio compuesto por neutrófilos, macrófagos, células granulares eosinofílicas y glóbulos rojos, representando el 56.25% (9/16) (Figura 2-c).

Estómago: Se evidenció gastritis supurativa en el 18.75% (3/16).

Hígado: La zona perihepática se observó engrosada con presencia de exudado inflamatorio compuesto por neutrófilos (algunos ya degenerados), macrófagos y células granulares eosinofílicas (CGE) asentados sobre fibrina condensada y en otros casos, observaron fibroblastos. Estas lesiones fueron compatibles con severa perihepatitis fibrinosupurativa aguda y en otros casos, de tipo crónica, en 37.5% (6/16). Un corte con 6.35% (1/16) evidenció nidos bacterianos.

En 12.5% (2/16) de los cortes fueron observados granulomas, compuesto por macrófagos agregados, los cuales fueron circunscritos por fibroblastos (Figura 3-4). Por otro lado, 75% (12/16) de los peces muestreados presentaron necrosis. Mientras que, en 56.25% (9/16) se evidenció esteatosis y degeneración hidrópica de hepatocitos.

Intestino: Se observó infiltración del epitelio intestinal, presencia de neutrófilos, macrófagos y melanomacrófagos representando 6.25% (1/16) de los casos. Infiltración de la serosa por macrófagos también fue observado en 6.25% (1/16) de los casos. En un corte con 6.25% (1/16), se observó además hiperplasia del epitelio y necrosis; compatible con una leve a moderada enteritis supurativa difusa aguda.

Músculo esquelético: El paquete muscular se observó con necrosis coagulativa representando 56.25% (9/16) de los casos (Figura 5), con presencia de algunas células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos y células granulares eosinofílicas) en 6.25% (1/16) de los casos.

Ojos: Las capas de la retina se observaron disgregadas, evidenciando un proceso de edema en 31.25% (5/16). El epitelio de la córnea, plexo corioideo y tejido adiposo se observaron severamente infiltrados, con presencia de exudado compuesto por neutrófilos y macrófagos (panoftlamitis y paniculitis), compatible con una moderada a severa panoftalmitis supurativa aguda, lo cual representa 81.25% (13/16) de los casos. (Figura 6).

Trece cortes con 81.25% (13/16) evidenciaron células del epitelio pigmentario retinal dispersas,

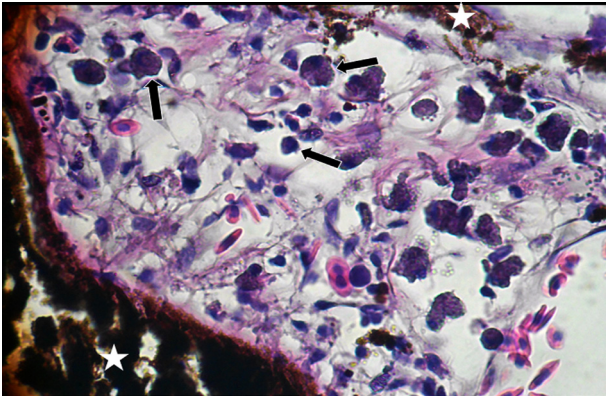


Figure 6. Histopathological findings in *Oreochromis niloticus*. Photomicrograph of the eye showing macrophages, neutrophils (arrows) and cells of the pigmentary epithelium (star). Hematoxylin-Eosine, Scale bar = 20 μ m.

comprising inflammatory cells (neutrophils and macrophages), consistent with acute suppurative dermatitis was observed, and representing 12.5%(2/16) cases.

Molecular Biology. From 16 tilapia characterized by biochemistry and histopathology positive presumed to *S. iniae*, any positive tilapia was found to real time PCR. However, it was estimated by uncertainty @Risk program (Palisade Corp), the mean prevalence of 0.66% (0.02% - 2.41%) for *S. iniae* in diseased tilapias or with clinical signs.

DISCUSSION

Peru has excellent prospects for aquaculture development and within this framework; the farming of tilapia is a promising activity. Also, in recent years it has increased consumption and acceptance of tilapia, in national and international markets (11). It is important to ensure optimal health status and provide a safe product to the consumer. To date, in Peru there are only reports of parasites present in this species of reared (12). So, this study represents some of the first reports on the identification of bacterial agents in tilapia.

The streptococci is one of the most important bacterial diseases affecting fish farming, and within species, *S. iniae* is considered the greatest impact on tilapia farming (9). Due to the morbidity, mortality and treatment costs it generates, and its impact on public health (13,14).

mostrando actividad fagocitaria.

Piel: En la epidermis se observó degeneración hidrópica y pérdida del epitelio con necrosis en un corte representando el 6.25% (1/16). Por otro lado, en la dermis se observó detritus e infiltración de exudado compuesto por células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos), compatible con una dermatitis supurativa aguda, representando 12.5% (2/16) de los casos.

Biología Molecular. De las 16 tilapias caracterizadas por bioquímica e histopatología presuntas positivas para *S. iniae*, ningún *pool* amplificó acima del *threshold* en la PCR en tiempo real dentro de los 40 ciclos. Sin embargo, se estimó mediante el programa de incertidumbre @Risk (Palisade Corp), la prevalencia media de 0.66% (0.02% - 2.41%) para *S. iniae* en las tilapias enfermas o con signos clínicos.

DISCUSIÓN

El Perú presenta excelentes perspectivas de desarrollo acuícola y dentro de este marco, la tilapicultura es una actividad promisoría. Así mismo, en los últimos años se ha incrementado el consumo y aceptación de la tilapia, tanto en el mercado nacional como internacional (11). Siendo importante garantizar un óptimo estado sanitario y ofrecer un producto inocuo al consumidor. Hasta la fecha, en el Perú sólo existen reportes de parásitos presentes en estas especies de cultivo (12), este estudio representa uno de los primeros informes sobre la identificación de los agentes bacterianos en tilapia.

La estreptococosis es una de las enfermedades bacterianas más importantes que afectan el cultivo de peces, y dentro de las especies, el *S. iniae* es considerada la de mayor impacto en el cultivo de tilapias (9). Debido a los índices de morbilidad, mortalidad y costos de tratamiento que genera, así como su repercusión en la salud pública (13,14).

Los principales hallazgos macroscópicos encontrados en este estudio como exoftalmia, opacidad de córnea, congestión en el cerebro, ascitis, petequias alrededor del poro anal, lesiones hemorrágicas y necróticas sobre la piel y tejido muscular, hepatomegalia, esplenomegalia, depósitos de fibrina en hígado y corazón fueron sugestivas de una infección por *Streptococcus* spp. (8).

El 34.31% de aislamientos de *Streptococcus* spp., a partir del cerebro encontrado en el presente estudio respalda la predilección de esta bacteria por este órgano; como es sugerido por Salvador et al (15), considerándolo un importante órgano

The main macroscopic findings in this study such as exophthalmos, corneal opacity, congestion in the brain, ascites, the bleeding anal pore, haemorrhagic and necrotic lesions on the skin and muscle tissue, liver, spleen, fibrin deposits in liver and heart were suggestive of *Streptococcus* spp. infection (8).

The 34.31% of isolates of *Streptococcus* spp., from the brain found in this study supports the predilection of this bacterium by this organ as suggested by Salvador et al (15), considering it an important organ for routine isolation. Also, it was determined that the spleen, kidney and liver are important organs for isolation of *Streptococcus* spp., which was 26.47%, 21.57% and 17.65% respectively.; these organs are also considered by Hernandez et al (16) as targets for their isolation. Even if in this study was not found a biochemical profile 100% typical to *S. iniae*, according to Anshary et al (17), we can infer that is due to the different variations between isolates as reported by Facklam et al (18).

Histopathological lesions observed in this study are consistent with infection by *Streptococcus* spp. The most affected tissues were: heart, liver, eye, spleen and brain; these organs are reporting that they would be the target organ of the bacteria, according to that found by Salvador et al (15).

The presence of epicarditis fibrinous, fibrinous perisplenitis, meningitis, hepatopancreatic granulomas, bacterial nests, necrotic foci, infiltration and presence hepatopancreas melanomacrophages centres is also reported by Chen et al (19) in positive tilapia to *S. iniae*, which until histopathology, could lead us to assume that the specie could be present in this fish farm. Also the ophthalmitis or panophthalmitis indicated the predilection of *Streptococcus* spp. for this organ, as was observed by Bromage and Owens (20). Furthermore, the exudate observed in all organs is mainly mononuclear, predominantly macrophages and neutrophils.

The 16S rRNA gene is usually used for the detection of *S. iniae*. However, Gibello et al (21) found that the gene encoding the protein lactate oxidase (*IctO*) is very unusual between species of *Streptococcus* spp.; for it, this gene is able to detect *S. iniae* with greater specificity than the 16S rRNA gene.

This study is the first to determine the presence of the genus *Streptococcus* spp., supported by microbiological isolation and pathological lesions in the Sullana province, Piura department, Peru.

para el aislamiento rutinario. Así mismo, se determinó que el bazo, riñón e hígado son órganos importantes para el aislamiento de *Streptococcus* spp., el cual fue de 26.47%, 21.57% y 17.65% respectivamente; estos órganos también son considerados por Hernández et al (16) como blancos para su aislamiento. Si bien en este estudio no se encontró un perfil bioquímico 100% característico de *S. iniae*, acorde a Anshary et al (17), podemos inferir que se debe a las diferentes variaciones entre aislados como es reportado por Facklam et al (18).

Las lesiones histopatológicas observadas en este estudio son compatibles con una infección por *Streptococcus* spp. Siendo, los tejidos más afectados: corazón, hígado, ojo, bazo, y cerebro; reportando que éstos serían los órganos blanco de esta bacteria, acorde a lo encontrado por Salvador et al (15).

La presencia de epicarditis fibrinosa, periesplenitis fibrinosa, meningitis, granulomas hepatopancreáticos, nidos bacterianos, focos necróticos, infiltración de hepatopáncreas y presencia de centros de melanomacrófagos es reportado también por Chen et al (19) en tilapias positivas a *S. iniae* por PCR, lo cual hasta la histopatología, podría llevarnos a suponer que la especie podría estar presente en este centro de cultivo. Así mismo, la oftalmitis o panoftalmitis señala la predilección de *Streptococcus* spp., por este órgano, como también fue observado por Bromage y Owens (20). Por otro lado, el exudado observado en todos los órganos caracterizados es principalmente mononuclear, con predominio de macrófagos y neutrófilos.

Algunos reportes indican que homólogos de el gen *IctO* sólo son observados en bacterias con metabolismo fermentativo como *S. iniae*, *Aerococcus viridans*, *S. equi* subsp. zooepidemicus, *S. pyogenes* y *Carnobacterium piscicola* (21). Por lo tanto, este gen puede ser utilizado como molécula diana específica para el desarrollo de ensayos de PCR específicos para la detección de *S. iniae* (22,23). No en tanto en este reporte no identificamos amplificaciones en PCR en tiempo real. Eso puede haber ocurrido debido a agentes inhibidores de la PCR dentro de las amuestras, que reducen la sensibilidad de la técnica (21), como también podría ser otra especie con características clínicas e histopatológicas semejantes a *S. iniae*.

Este estudio es el primero en determinar la presencia del género *Streptococcus* por aislamiento microbiológico y lesiones anatomopatológicas compatibles con este agente bacteriano en una piscigranja de la provincia de Sullana, departamento de Piura, Perú. Se puede concluir que la especie *S.*

It can be concluded that the species *S. iniae* was not present in the specimens of *O. niloticus* analysed in this fish farm to the limit prevalence of 2.7%. However, is necessary to confirm the species of *Streptococcus* found in this important farming centre for our country; because the clinic signs and lesions are not pathognomonic for *Streptococcus* infection, for this becomes necessary the use of molecular identification.

Acknowledgements

The authors thank to the Vice Rectorate of Research - High Council of Research - of the San Marcos University for the financing of the projects: Multidisciplinary Project and CONCON (Code N° 140 801 031).

iniae no estaba presente en los ejemplares de *O. niloticus* analizados en este centro de cultivo a la prevalencia límite de 2.7%. Sin embargo, es necesario realizar la confirmación molecular de la especie de *Streptococcus* que se encuentra en este importante centro de cultivo para nuestro país; pues los signos clínicos y lesiones encontrados no son exclusivos de una especie determinada de *Streptococcus*, lo cual complica más su diagnóstico laboratorial, siendo necesario el uso de pruebas moleculares más específicas para su determinación.

Agradecimientos

Al Vicerrectorado de Investigación - Consejo Superior de Investigaciones - de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento de los proyectos: Proyecto Multidisciplinario y CON CON (Código N° 140801031).

REFERENCES

1. Padua SB, Menezes-Filho RN, Martins ML, Belo MAA; Ishikawa MM, Nascimento CA, Saturnino KC, Carrijo-Mauad JR. A survey of epitheliocystis disease in farmed Nile tilapia (Linnaeus, 1758) in Brazil. *J Appl Ichthyol* 2015; 31(5):927-930.
2. Jiménez AP, Rey AL, Penagos LG, Ariza MF, Figueroa J, Iregui CA. *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. *Rev Med Vet Zoot* 2007; 54(2):285-294.
3. Castro MP, Claudiano GS, Petrillo TR, Shimada MT, Belo MAA, Machado CMM, Moraes JRE, Manrique WG, Moraes FR. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fish Shellfish Immunol* 2014; 36(1):284-290.
4. Padua SB, Menezes-Filho RN, Belo MAA, Nagata MM. Nutritional additive Increases the survival rate and decreases parasitism in tilapia during the masculinization. *Aqua Culture Asia Pacific* 2014; 10(5):24-27.
5. Sakabe R, Moraes FR, Belo MAA, Moraes JER, Pilarski F. Kinects of cronic inflammation in Nile tilapia supplemented with essential fatty acids n-3 and n-6. *Pesq Agropec Bras* 2013; 48(3):313-319.
6. Manrique WG, Claudiano GS, Petrillo TR, Castro MP, Figueiredo MAP, Belo MAA, Moraes JRE, Moraes FR. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies. *J Appl Ichthyol* 2014; 30(5):1001-1006.
7. Marcusso PF, Yunis J, Claudiano GS, Manrique WG, Salvador R, Moraes JRE, Moraes FR. Sodium fluorescein for early detection of skin ulcers in *Aeromonas hydrophila* infected *Piaractus mesopotamicus*. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 2014; 34(3):102-106.
8. Amal MNA, Zamri-Saad M. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. *Pertanika. J of Tropic Agricul Sci* 2011; 34(2):195-206.
9. Agnew W, Barnes A. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet Microb* 2007; 122(1-2):1-15.

10. Haenen O, Evans J y Berthe F. Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. *Ver sci tech Off Int Epiz* 2013; 32(2):497-507.
11. Guerrero, PMB, León, JP, Valdivia, LM. Producción, comercialización y perspectivas de desarrollo de la acuicultura peruana. *Científica* 2014; 11(2):118-133.
12. Asencios YO, Sánchez FB, Mendizábal HB, Pusari KH, Alfonso HO, Sayán AM, Figueiredo MAP, Manrique WG, Belo MAA, Chaupe NS. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquac Rep* 2016; 4:74-79.
13. Manrique WG, da Silva C, de Castro MP, Petrillo TR, Figueiredo MP, de Andrade MA, et al. Expression of cellular components in granulomatous inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus* Model. *PLoS ONE* 2015; 10(3):e0121625.
14. Figueiredo HC, Nobrega L, Leal CA, Pereira U, Mian G. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. *Brazil J Microbiol* 2012; 43(2):576-580.
15. Salvador R, Eckehardt E, de Freitas J, Leonhardt J, García L, Alves J. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. Group B. in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Paraná State, Brazil. *Ciencia Rural* 2005; 35(6):1374-1378.
16. Hernández E, Figueroa J, Iregui C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *J Fish Dis* 2009; 32:247-252.
17. Anshary H, Kurniawan RA, Sriwulan S, Ramli R, Baxa DV. Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *SpringerPlus* 2014;3:627.
18. Facklam R, Elliot J, Shewmaker L y Reingold A. Identification and characterization of sporadic isolates from humans. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2):933-937.
19. Chen CY, Chao CB, Bowser PR. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*-infected tilapia. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 2007; 27(1):2-9.
20. Bromage ES, Owens L. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different troutes of exposure. *Dis Aquat Org* 2002; 52(3):199-205.
21. Cai SH, Wang B, Lu YS, Jian JC, Wu ZH. Development of loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Streptococcus iniae*, the causative agent of streptococcosis in fish. *J Basic Microbiol* 2012; 52:116-122.
22. Gibello A, Collins MD, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF, Richardson PT. Cloning and analysis of the L-lactate utilization genes from *Streptococcus iniae*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(10):4346-4350.
23. Mata AI, Blanco MM, Domínguez L, Fernández-Garayzabal JF, Gibello A, Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. *Vet Microbiol* 2004; 101: 109-116.