

Estreptococosis en Tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas en Colombia

Andrés Pulido¹, Carlos Iregui¹, Judith Figueroa², Phillip Klesius³

¹ Laboratorio de Patología. Facultad de Medicina y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria. Bogotá D.C. (Colombia)
e-mail: dcairegui@veterinaria.unal.edu.co

² Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria. Bogotá D.C. (Colombia)

³ Fish Diseases and Parasites Research Lab., USDA, Agricultural Research Service
Box 952, Auburn, AL 36830, (USA)

Resumen

Se investigó una mortalidad endémica en una explotación de híbridos de Tilapia Roja (*Oreochromis* spp.) en el Departamento del Tolima (Colombia). Los principales signos clínicos fueron de origen nervioso con nado errático, dificultad en la natación y letargia. Las lesiones macroscópicas más evidentes fueron exoftalmia, áreas rojizas y pardas en la región periorbital, grados diversos de epicarditis, esplenomegalia y un contenido intestinal amarillo-rojizo. Se procesaron por técnicas de histopatología, microscopía electrónica de transmisión (MET) y microbiología muestras de animales sanos y clínicamente enfermos. La principal alteración fue una reacción inflamatoria granulomatosa y un exudado básicamente mononuclear. Las lesiones incluyeron meningoencefalitis, epicarditis, infiltración mononuclear en el ojo, bazo, riñón, branquias y tracto gastrointestinal, así como diferentes grados de dilatación de los sinusoides hepáticos. Todas las lesiones estuvieron relacionadas con cocos Gram +. Por medio de MET se observó la localización intrafagosómica y citoplasmática de los cocos con una cápsula muy prominente y la evidente viabilidad de la bacteria. Las muestras de cerebro para microbiología permitieron obtener cultivos puros de cocos Gram +. Las colonias fueron clasificadas como *Streptococcus* sp. Nuestros resultados avalan en buena parte, pero también muestran desacuerdo con reportes de distintos autores en infecciones por diversos cocos Gram +, incluyendo *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., en Tilapias y otras especies piscícolas en numerosos países. Este es el primer reporte de un caso clínico originado por esta bacteria en peces cultivados en Colombia.

Summary

Streptococcosis in cultured Tilapia (*Oreochromis* spp.) in Colombia

An endemic mortality affecting a freshwater commercial aquaculture facility of Tilapia hybrids (*Oreochromis* spp.) in Tolima (Colombia) was investigated. The main clinical signs observed were nervous with erratic swimming, difficulty for swimming, and lethargy. The main gross lesions were exophthalmia, periorbital brownish and reddish discolored areas, extensive epicarditis, splenomegaly, hepatic pallor and yellow-reddish intestinal content. Histopathological, transmission electron microscopy (TEM), and microbiological samples of healthy animals and clinically ill ones were processed by standard procedures. The main response consisted of granulomatous inflammation in many organs and a basically mononuclear exudate. The lesions included meningoencephalitis, epicarditis, mononuclear cell infiltration of the eye, spleen, kidney, gills, and intestinal tract, as well as liver sinusoids dilation in various degrees. All lesions were related with the presence of Gram-positive cocci. TEM of brain samples disclosed the intraphagosomic and cytoplasmic location of the cocci which showed a very prominent capsule and the evident viability of the bacterium. Brain samples from diseased fishes were cultured overnight on BHI agar with sheep blood at 37°C, pure cultures of Gram + cocci were recovered. Isolated colonies were classified as *Streptococcus* sp. on the basis of morphological, physiological and biochemical tests. The results of this study show good agreement, but also differences with reports from several authors in infections by diverse Gram-positive cocci, including *Streptococcus* sp. and *Enterococcus*

sp., in Tilapias and other fish species in numerous countries. This is the first report of a clinic case originated by this bacterium in cultured fish in Colombia.

Key words: Tilapia, Gram-positive cocci, Histopathology, Microbiology, Transmission electron microscopy

Introducción

Desde el primer aislamiento de una especie del género *Streptococcus* sp. en Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) por Hoshina y cols. en 1958 en el Japón, se han hecho una gran cantidad de aislamientos de éste y de otros cocos Gram + en una gran variedad de especies ícticas, tanto de agua dulce como salada, sin que exista hasta el momento una clara metodología para su manejo y control (Bercovier y cols., 1997). En 1997 se estimaba que las pérdidas económicas anuales debidas a la infección por *Streptococcus* sp. en todas las especies piscícolas cultivadas podían superar los 150 millones de dólares en el mundo entero (Shoemaker y Klesius, 1997).

Este trabajo muestra los principales hallazgos en un proceso patológico que ocasiona mortalidad en una explotación de híbridos de Tilapia Roja (*Oreochromis* spp.) cultivados en jaulas en Colombia, donde se logró el aislamiento de una bacteria perteneciente al género *Streptococcus* sp. y se identificaron diversas lesiones comparables con lo reportado en la literatura para este patógeno en ésta y otras especies piscícolas.

Material y métodos

Características de la explotación

La empresa está ubicada en el Departamento del Tolima, Colombia; a una altura de \pm 360 msnm, con una temperatura media de 28 a 30°C y una precipitación pluvial promedio de 2089 mm. La explotación se dedica a la reproducción, cría y engorde de híbridos de Tilapia Roja (*Oreochromis* spp.) utilizando un sistema de explotación semiintensivo en jaulas flotantes.

Toma y procesamiento de muestras

Se tomaron muestras de peces de las etapas de levante y engorde, son éstas las edades en que principalmente se manifiesta la enfermedad clínicamente.

Para la evaluación macroscópica se llevaron a cabo 360 necropsias de peces con todos los signos característicos, dentro de éstos se incluyeron 30 especímenes normales. Se anestesiaron con tricaine methanesulfonate (MS222, Crescent Research Chem.) y posteriormente fueron insensibilizados por un corte de la médula espinal. Para la evaluación microscópica se tomaron 30 peces, 24 animales con signos clínicos y 6 clínicamente normales; se tomaron muestras de cerebro, ojo, corazón, hígado, bazo, riñón, estómago, intestinos, branquias, gónadas y músculo, las cuales se fijaron inmediatamente en formalina tamponada al 3,7%. Los tejidos fueron procesados para la técnica de rutina con hematoxilina y eosina y con tinción de Gram para algunos cortes específicos (Luna, 1968).

Para microscopía electrónica de transmisión (MET) se tomaron muestras de cerebro de cinco peces con la sintomatología nerviosa característica, fueron fijadas en

glutaraldehído al 2% en buffer de Millonig modificado (pH 7,2), postfijadas con tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% en buffer fosfato, deshidratadas con concentraciones ascendentes de etanol e infiltradas e incluidas en una mezcla de epon-araldita (Polysciences Inc.). Se practicaron cortes de 40 nm de grosor, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, los cuales fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión (Phillips, Model: CM 10).

Para el análisis bacteriológico se cultivaron muestras de cerebro de 27 animales afectados en placas de agar BHI con 5% de sangre ovina a 37°C, en medio aeróbio; los crecimientos catalogados como positivos se colorearon con Gram y se les practicaron las siguientes pruebas bioquímicas y de crecimiento: catalasa, hemólisis, test de Camp, motilidad, crecimiento a 10°C y 45°C, a un pH de 9,6 y a una concentración de NaCl del 6,5%; prueba de fermentación de los azúcares: melezitosa, manitol, galactosa y salicina y test de hidrólisis del almidón.

Resultados

La signología principal fue una alteración en el comportamiento y nado anormal de los peces: nado errático (en círculos), dificultad en la natación, rigidez y curvamiento dorsal, además de letargia o indiferencia al medio; con menor frecuencia se presentaron otros signos como dilatación abdominal y dificultad respiratoria. Estos signos se acompañaron de manera frecuente con exoftalmia uni o bilateral con opacidad corneal.

En general, no se encontraron lesiones externas; sin embargo, ocasionalmente se observó erosión de las aletas, pequeños nódulos blanquecinos en la base de éstas y coloración rojo pálido de las branquias.

Internamente se demostró de manera predominante: apariencia pardusca o hemorrágica del contenido retrobulbar y perimeningeo, leve a severa deposición de un material fibrinoso en el epicardio, palidez hepática, dilatación de la vesícula biliar, contenido mucoso pardo-rojizo en el intestino y esplenomegalia. Con menor frecuencia se encontraron múltiples quistes en el hígado pletóricos de un material acuoso translúcido, en ocasiones afectando prácticamente todo el órgano.

Microscópicamente, la principal respuesta inflamatoria en prácticamente todos los órganos consistió en una reacción de tipo granulomatosa con un infiltrado compuesto fundamentalmente de macrófagos, asociado a una menor presencia de linfocitos, *rodlet cells* y células granulares eosinofílicas (EGCs).

Las lesiones incluyeron una leve a severa meningoencefalitis hemorrágica y/o granulomatosa con áreas de demielinización y malacia (Figura 1), reacción inflamatoria en la coroides y esclerótica con focos de hemorragia, hemólisis y edema en el globo ocular y diversos grados de epicarditis llegando a invadir la capa esponjosa del miocardio y cubriendo prácticamente todo el órgano (Figura 2).

Los quistes en el hígado, evidentes macroscópicamente, correspondieron a severos focos de dilatación sinusoidal (telangiectasia), con una leve reacción inflamatoria en su periferia y un contenido de material proteináceo, eritrocitos, mononucleares y bacterias (Figura 3); adicionalmente, se observaron diversos grados de vacuolización citoplasmática de los hepatocitos y una leve reacción inflamatoria perivascular. En el bazo y riñón fue común observar focos de esplenitis y nefritis intersticial granulomatosa.

Figura 1. Cerebro de tilapia infectado con *Streptococcus* sp. Severa meningoencefalitis hemorrágica (H) y granulomatosa (M). Extensas zonas de malacia en la corteza cerebral (←→) y ventriculitis (↗) (H & E, 40 x).

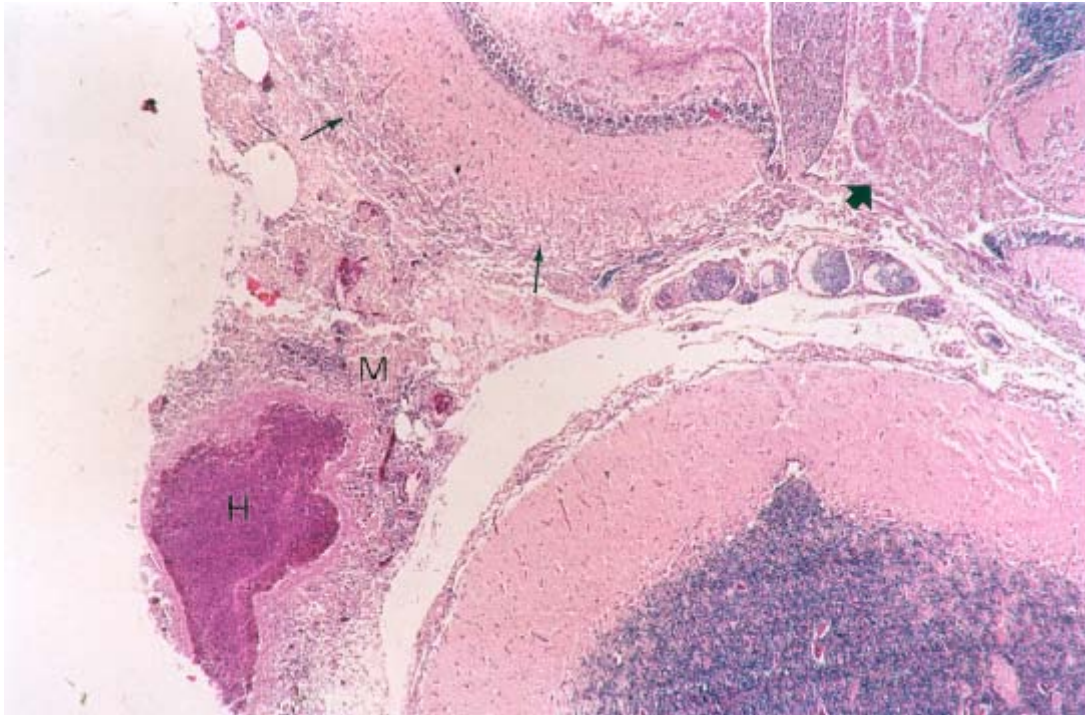


Figura 2. Extensa epicarditis (E) que cubre la pared ventricular (↗) (H & E, 200x).

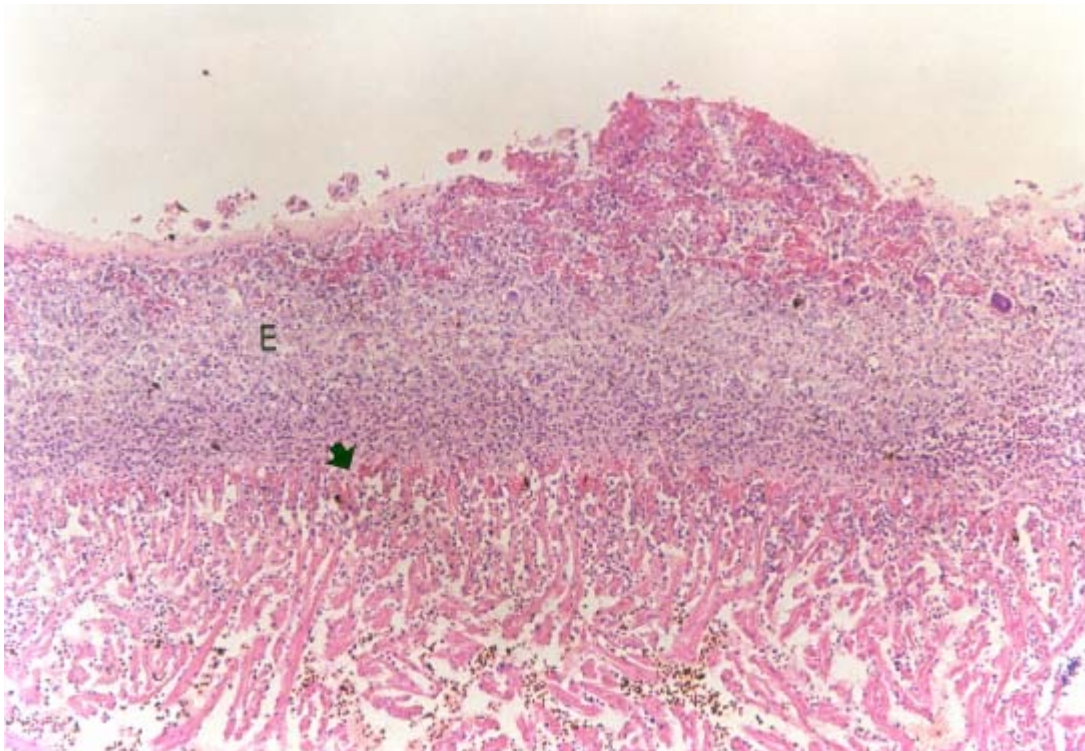
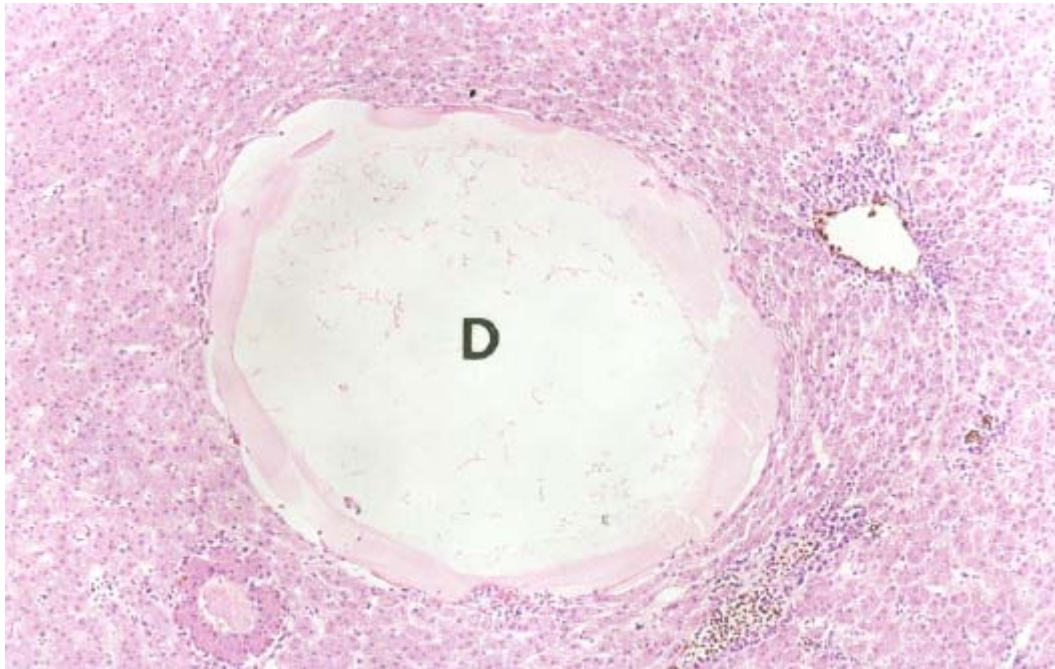
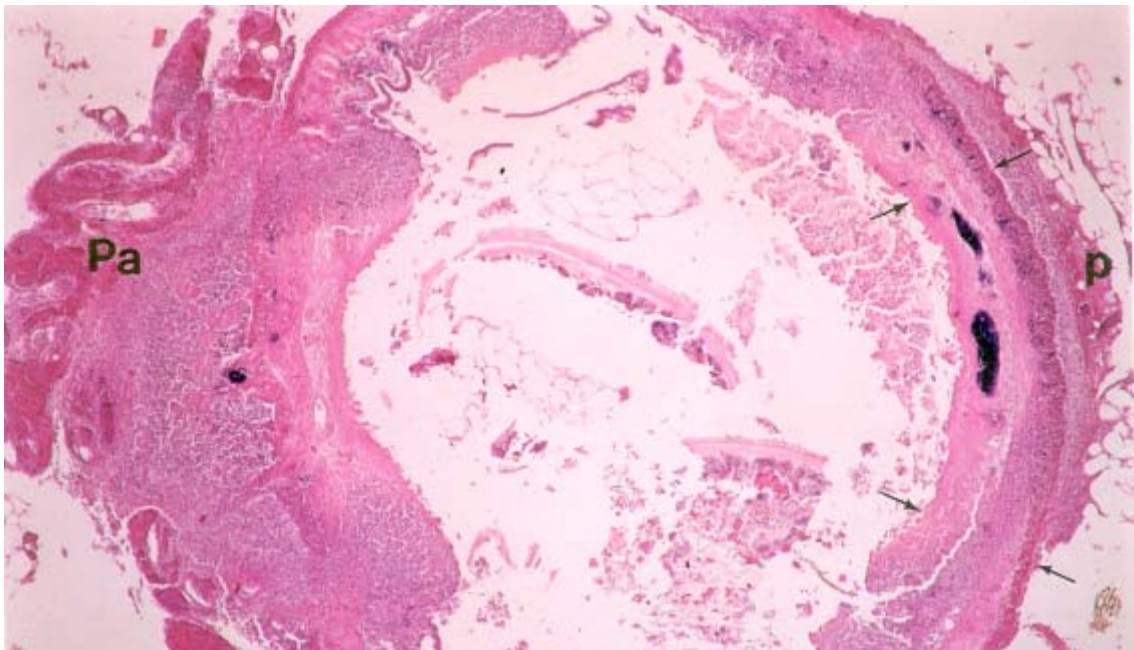


Figura 3 Hígado con severa dilatación de los sinusoides (D) con material eosinofílico homogéneo en su interior (H & E, 40x).



En la submucosa del estómago se notaron focos de gastritis, dilatación de los vasos linfáticos y degeneración de las células epiteliales de la mucosa. En el intestino se identificó desde una extensa degeneración y necrosis de las células epiteliales hasta severos focos de enteritis necrótica difteróide alcanzando inclusive la serosa, páncreas y tejido adiposo adyacente provocando claras zonas de peritonitis (Figura 4).

Figura 4. Intestino con severa enteritis necrótica y difteróide. Se nota la pérdida total de la arquitectura, la lesión involucra la totalidad de la pared (↔ ↔), llega hasta la serosa donde produce peritonitis (p) y pancreatitis (Pa) (H & E, 40x).



En las branquias se observaron zonas de branquitis, lamelitis distal, hiperplasia epitelial interlamelar, edema, atrofia y fusión lamelares, diversos grados de infiltración en el arco branquial y leve presencia de tremátodos monogéneos. Las gónadas ocasionalmente estuvieron afectadas.

La formación de típicos granulomas con detritus y bacterias en su interior se pudo notar en el encéfalo, epicardio, bazo, riñón, coroides y esclerótica. Asociados a prácticamente todas las anteriores lesiones se encontraron cocos Gram + ubicados de manera preferencial en el interior de los macrófagos.

Por la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) llamó especialmente la atención la ubicación intrafagosómica de las bacterias en los macrófagos, muchas de ellas con una apariencia sana representada por una pared perfectamente identificable en todas sus subdivisiones sin disolución alguna; tal afirmación se ve confirmada porque los microorganismos no sólo son capaces de conservarse bien en esta localización sino que se replican con buen éxito allí, además del elevado número de ellas en cada macrófago (Figuras 5 y 6). Igualmente se identificó una cápsula bacteriana muy desarrollada (Figura 7).

Figura 5. MET de macrófagos con *Streptococcus* sp libres en su citoplasma (→) y en los fagosomas (▶) (magnificación original x 4900).

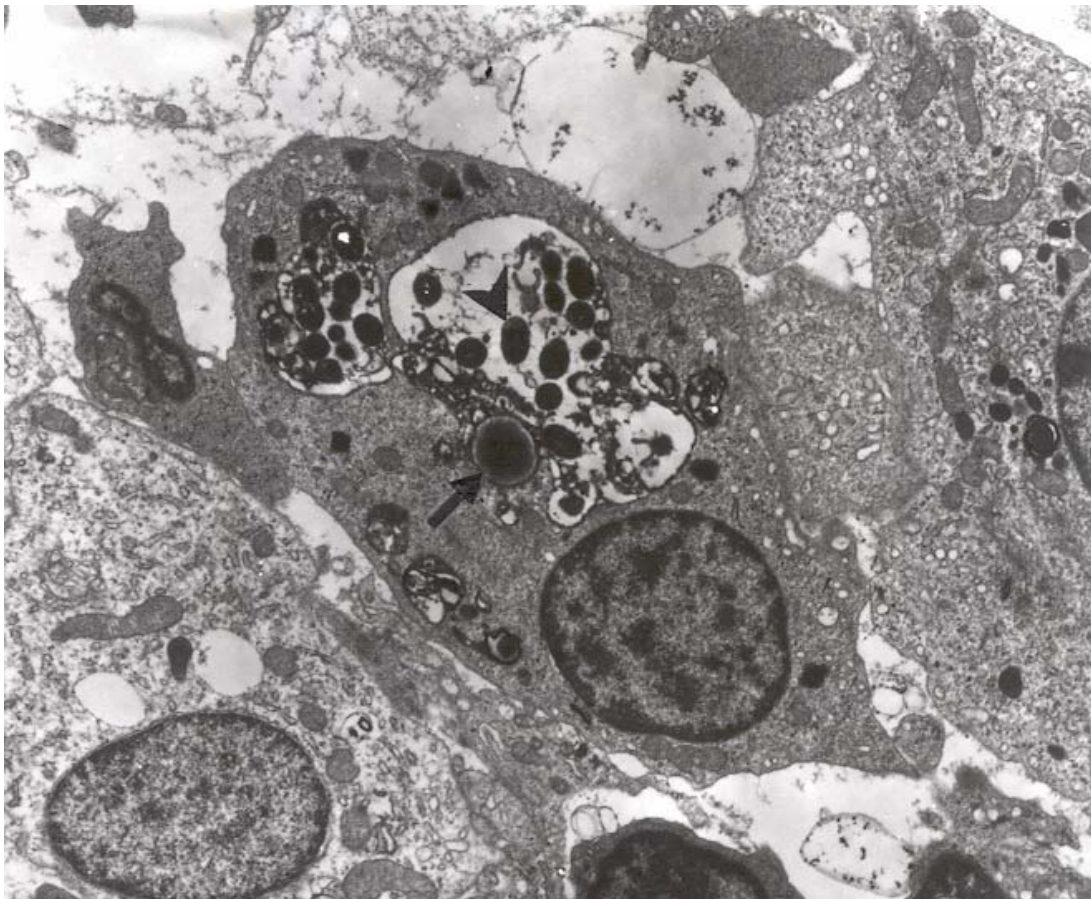


Figura 6. Aproximación de los fagosomas donde se comprueba la perfecta conservación y viabilidad de las bacterias, algunas de ellas en proceso de división (↔) (magnificación original x 28 500).

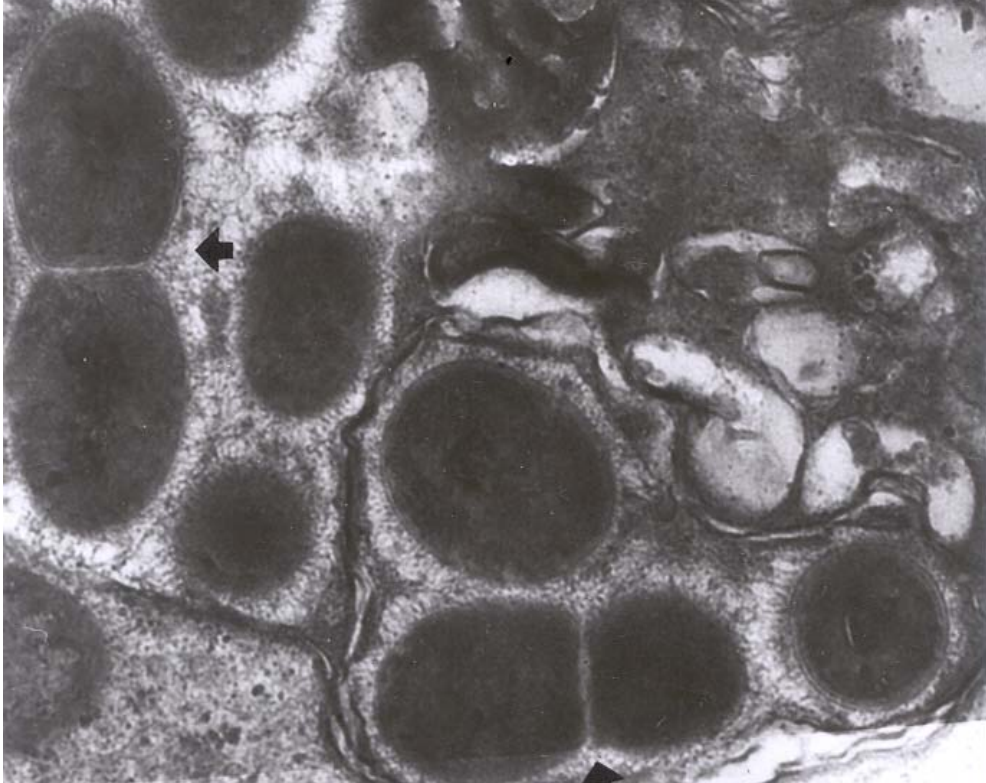
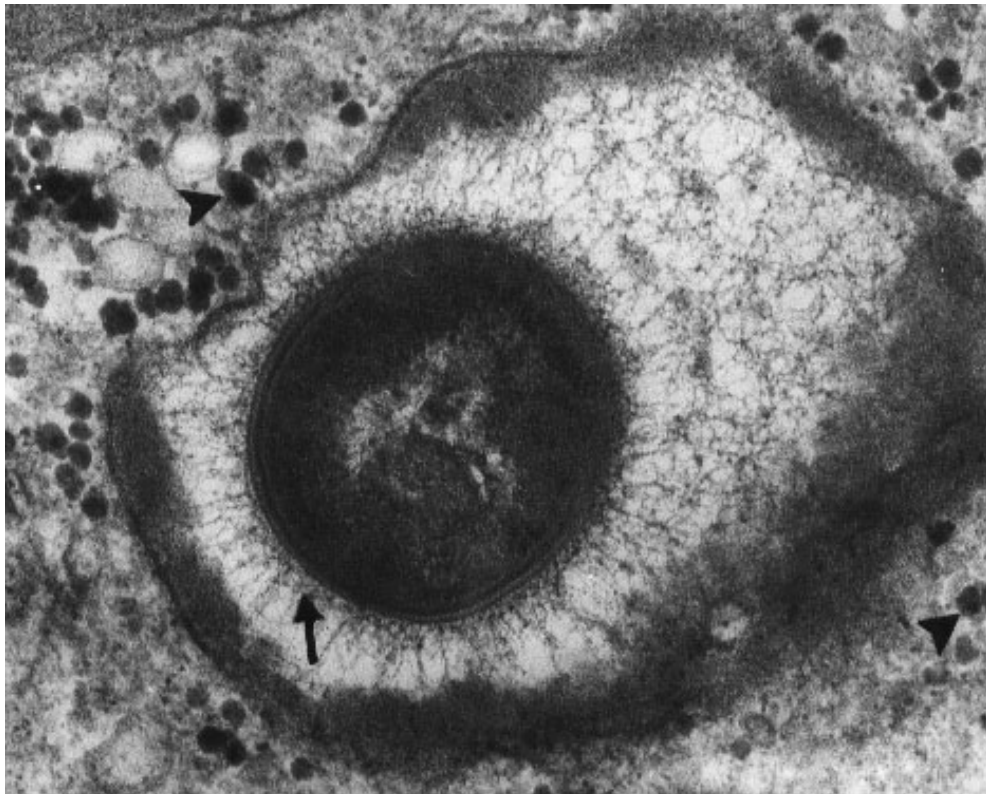


Figura 7. Mayor magnificación de la bacteria en un fagosoma en el interior de un macrófago. Se nota su evidente viabilidad y su cápsula filamentosa muy prominente (→). Pueden verse también algunos lisosomas periféricos (▷) (magnificación original x 52 000).



En microbiología se obtuvo el crecimiento de colonias pequeñas blanco-grisáceas altamente mucoides en 25 de las 27 muestras, las cuales correspondieron a un coco Gram +, catalasa negativo, solo o formando cadenas cortas. Las características de crecimiento y bioquímicas fueron las siguientes: hemólisis α o negativa, motilidad y test de Camp negativo, crecimiento negativo a 10°C, a 45°C y a una concentración de 6,5% de NaCl, crecimiento positivo a pH de 9,6, fermentación positiva de melezitosa, manitol, galactosa y salicina e hidrólisis negativa del almidón. Con base en lo anterior esta bacteria fue clasificada inicialmente como *Streptococcus* sp.

Discusión

Gran parte de los signos clínicos descritos han sido documentados en Tilapias por Eldar y cols. (1995) y Chang y Plumb (1996), en Truchas por Boomker y cols. (1979) y Bercovier y cols. (1997), en todos ellos ocasionados por *Streptococcus* sp.; y en Yellowtail y Anguilas por Kusuda y cols. (1978) causados por *Enterococcus seriolicida* (ahora clasificada como *Lactococcus garviae*), entre otros.

La mayoría de las lesiones macroscópicas han sido reportadas por Chang y Plumb (1996) en Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Streptococcus* sp. y por Baya y cols. (1990) en varios peces marinos ocasionadas por esta misma bacteria y por Nieto y cols. (1995) en Turbot (*Scophthalmus maximus*) por *Enterococcus* sp., entre otros. Los quistes en el hígado demostrados desde el examen macroscópico no son reportados explícitamente por ninguno de los autores consultados.

La reacción inflamatoria de tipo granulomatosa y con predominio de mononucleares sugieren un proceso patológico crónico. La formación de granulomas en diferentes órganos ha sido descrita en híbridos de Tilapia infectados con *S. iniae* (Perera y cols., 1998) y en Tilapia Nilótica con *Streptococcus* sp. (Chang, 1994; Chang y Plumb, 1996). No obstante, esto está en desacuerdo con los hallazgos de autores como Bowser y cols. (1998) en Tilapias y Boomker y cols. (1979) y Ceschia y cols. (1992) en Truchas en infecciones provocadas por *Streptococcus* sp., así como en los de Kusuda y Salati (1993) en diversas especies de peces por *Enterococcus* sp. y Prieta y cols. (1993) en Trucha Arco Iris por *Lactococcus garviae*, quienes reportan lesiones características de una septicemia hemorrágica. Adicionalmente, no concuerda con los autores que describen un exudado inflamatorio de tipo neutrofilico como Ferguson y cols. (1994) en estreptococcosis en peces de acuario y Nieto y cols. (1995) en una infección por *Enterococcus* sp. en Turbot, por ejemplo.

Lo anterior parecería indicar distintas formas de presentación del proceso patológico entre las diferentes especies ícticas y según la especie de coco involucrado. Si tenemos en cuenta lo descrito por Miyasaki y cols. (1984), quienes describieron dos formas de estreptococcosis: una caracterizada por una inflamación granulomatosa cuando la enfermedad es inducida por una bacteria α -hemolítica y una forma septicémica o una inflamación supurativa extensa de los ojos cuando la infección lo es por un coco β -hemolítico, nuestros hallazgos coincidirían con un tipo de infección causada por un *Streptococcus* sp. α -hemolítico, lo cual efectivamente pudo ser comprobado bacteriológicamente en la mayoría de los casos.

Ultraestructuralmente es bastante notorio cómo esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos como consecuencia posiblemente de la formación de una cápsula tan evidente (Figuras 6 y 7). En diferentes tipos de

bacterias como *Streptococcus* del grupo B (GBS), *S. aureus*, *S. suis*, *Pasteurella multocida* y *Klebsiella pneumoniae*, entre otras, la cápsula es reconocida como uno de los factores de virulencia más importantes, aumentando especialmente su resistencia a la opsonización y fagocitosis (Domenico y cols, 1994; Alonso de Velasco y cols, 1995; Brazeau y cols, 1996; Cornacchione y cols, 1998; Poermadjaja y Frost, 2000; Cunnion y cols, 2001). Resultados similares han sido demostrados en peces infectados con cepas de *Streptococcus* sp. β -hemolítico y de *E. seriolocida* (*L. garviae*) (Yoshida y cols, 1996; Yoshida y cols, 1997).

Los GBS pueden ser fagocitados sin necesidad de opsonización interactuando directamente con receptores del macrófago, lo que a su vez les posibilitaría evadir las actividades antibacteriales intrafagosomales, para ello utilizan posiblemente diversos mecanismos como la inhibición de la fusión fagolisosomal, contrario a lo que parece suceder con bacterias que han sido opsonizadas previo a la fagocitosis (Valentin-Weigand y cols, 1996; Cornacchione y cols, 1998).

De lo observado en este caso, aunque es evidente la viabilidad de las bacterias por la integridad de su pared y su capacidad de división, no se puede asegurar el mecanismo utilizado por las bacterias para impedir su destrucción dentro de los fagosomas; de todas formas, la posesión de la cápsula parecería hacer menos efectivo y aún imposibilitar el contacto del contenido del fagosoma con la pared bacteriana. Adicionalmente, la fusión y liberación del contenido de los lisosomas dentro de los fagosomas pudiera verse obstaculizada.

No existe una correspondencia exacta entre las características de los cocos Gram + identificados específicamente hasta el momento y el aislamiento realizado en el presente estudio, lo cual podría indicar básicamente que se trata de una nueva especie de *Streptococcus* o, más probablemente, una cepa variable de algunas de las especies anteriormente mencionadas.

En conclusión, en el presente caso clínico provocado por un *Streptococcus* sp. se observó la sintomatología característica reportada en procesos originados por diversos cocos Gram +, asociado a una afección crónica bastante severa de prácticamente todos los órganos; ultraestructuralmente se confirmó la ubicación dentro de los fagosomas de macrófagos, y la viabilidad intracelular de los microorganismos. Estos hallazgos evidencian la necesidad de plantear futuros estudios epidemiológicos y de patogenénesis que contribuyan a un mayor entendimiento del comportamiento de la bacteria en una población y dentro del huésped y al diseño estrategias de control.

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Patricia Barrera por su excelente procesamiento de los tejidos para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), al personal de la granja piscícola, a Gilberto, a Margarita; es decir, a todas aquellas personas que le dieron soporte técnico y humano a este proyecto. Este trabajo fue soportado económicamente con recursos de la Empresa piscícola donde se llevó a cabo el estudio.

Bibliografía

1. Alonso de Velasco, E., F.M. Verheul, J. Verhoef y H. Snippe. (1995). *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiol. Rev., 59:591-603
2. Baya, A.M., B. Lupiani, F.M. Hetrick, B.S. Roberson, R. Lukacovic, E. May y C. Poukish. (1990). Association of *Streptococcus* sp. with mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. J. Fish. Dis., 13:251-253

3. Bercovier, H., C. Ghittino y A. Eldar. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with Streptococci and related organisms. *Fish Vaccinology*, 90:153-160
4. Boomker, J., G.D.Jr. Imes, C.M. Cameron, T.W. Naude y H.J. Schoonbee. (1979). Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *Ond. J. Vet. Res.*, 46:71-77
5. Bowser, P.R., G.A. Wooster, R.G. Getchell y M.B. Timmons. (1998). *Streptococcus iniae* infection of Tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. *J. World Aqua. Soc.*, 29:335-339
6. Brazeau, C., M. Gottschalk, S. Vincelette y B. Martineau-Doize. (1996). *In vitro* phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiol.*, 142:1231-1237
7. Ceschia, G., G. Giorgetti, R. Giavenni y M. Sarti. (1992). A new problem for Italian Trout farms: Streptococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, 12:71-72
8. Chang, P.H. (1994). *Streptococcus* infection of fish. Ph.D. Thesis. Auburn University, Auburn, AL
9. Chang, P.H. y J.A. Plumb. (1996). Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. infection in Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and channel Catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish. Dis.*, 19:235-241
10. Cornacchione, P., L. Scaringi, K. Fettucciari, E. Rosati, R. Sabatini, G. Orefici, C. Von Hunolstein, A. Modesti, A. Modica, F. Minelli y P. Marconi. (1998). Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunol.*, 93:86-95
11. Cunnion, K., J. Lee y M. Frank. (2001). Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 69:6796-6803
12. Domenico, P., R. Salo, A. Cross y B. Cunha. (1994). Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 62:4495-4499
13. Eldar, A., Y. Bejerano, A. Livoff, A. Horovitz y H. Bercovier. (1995). Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet. Microbiol.*, 43:33-40
14. Ferguson, H.W., J.A. Morales y V.E. Ostland. (1994). Streptococcosis in aquarium fish. *Dis. Aquat. Org.*, 19:1-6
15. Kusuda, R., I. Komatsu y K. Kawai. (1978). *Streptococcus* sp. isolated from an epizootic of cultured eels. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44:295
16. Kusuda, R. y F. Salati. (1993). Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Ann. Rev. Fish. Dis.*, 69-85
17. Luna, G. (1968). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces*. Institut of Pathology. 3rd ed. Graw Hill. Toronto, Canada.
18. Miyazaki, T., S.S. Kubota, N. Kaige y I. Miyashita. (1984). A histopathological study of streptococcal disease in Tilapia. *Fish. pathol.*, 19:167-172
19. Nieto, J.M., S. Devesa, I. Quiroga y A.E. Toranzo. (1995). Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed Turbot, *Scophthalmus maximus*. *L. J. Fish. Dis.*, 18:21-30
20. Perera, R.P., R.A. Fiske y S.K. Johnson. (1998). Histopathology of hybrid Tilapias infected with a biotype of *Streptococcus iniae*. *J. Aquat. Anim. Health.*, 10:294-299
21. Poermadjaja, B. y A. Frost. (2000). Phagocytic uptake and killing of virulent and avirulent strains of *Pasteurella multocida* of capsular serotype A by chicken macrophages. *Vet. Microbiol.*, 72:163-171
22. Prieta, J., A.M. Doménech, J.F. Fernández-Garayzábal, M.D. Collins, U.M. Rodrigues, D. Jones, A. Rodríguez y L. Domínguez. (1993). Lactococcosis de la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Med. Vet.*, 10:367-373
23. Shoemaker, C. y P. Klesius. (1997). Streptococcal disease problems and control: a review. En: *Tilapia Aquaculture*. Vol. 2. K. Fitzsimmons. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY. 671-682.
24. Valentin-Weigand, P., P. Benkel, M. Rohde y G.S. Chhatwal. (1996). Entry and Intracellular survival of group B Streptococci in J774 macrophages. *Infect. Immun.*, 64:2467-2473
25. Yoshida, T., Y. Yamada, M. Sakai, V. Inglis, X.J. Xie, S.C. Chen y R. Kruger. (1996). Association of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in β -hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from Rainbow Trout. *J. Aquat. Anim. Health.*, 8:223-228
26. Yoshida, T., M. Endo, M. Sakai y V. Inglis. (1997). A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolocida* isolated from Yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. Aquat. Org.*, 29:233-235