



DANIELA TUPY DE GODOY

**RELAÇÕES CLONAIS, GENES DE
VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE
Streptococcus agalactiae ISOLADOS DE PEIXES**

LAVRAS – MG

2011

DANIELA TUPY DE GODOY

**RELAÇÕES CLONAIS, GENES DE VIRULÊNCIA E
PATOGENICIDADE DE *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE PEIXES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Godoy, Daniela Tupy de.

Relações clonais, genes de virulência e patogenicidade dos
Streptococcus agalactiae isolados de peixes / Daniela Tupy de
Godoy. – Lavras: UFLA, 2011.

78 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo.

Bibliografia.

1. MLST. 2. Sorotipo capsular. 3. Diversidade genética. 4.
Tilápia do Nilo. 5. Patogenicidade *in vivo*. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3758042322

DANIELA TUPY DE GODOY

**RELAÇÕES CLONAIS, GENES DE VIRULÊNCIA E
PATOGENICIDADE DE *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE PEIXES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 29 de julho de 2011.

Dr. Antonio Chalfun Júnior	UFLA
Dra. Fátima Maria de Souza Moreira	UFLA
Dra. Gláucia Frasnelli Mian	UFLA
Dr. Rômulo Cerqueira Leite	UFMG

Dr. Henrique César Pereira Figueiredo
Orientador

LAVRAS – MG

2011

Ao meu pai, Paulino Godoy, à minha
mãe, Telma, à minha irmã, Marília e a
todos os loucos que se aventuram pelo
mundo acadêmico...

...dedico.

AGRADECIMENTOS E/OU A HISTÓRIA DE UMA TESE

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry.

Foi há 4 anos e meio que comecei algo... que hoje apresento a vocês. Não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia não ter fim. Foi um grande desafio superar os contratemplos que apareceram, e foram muitos! Felizmente, durante meu percurso, pude contar com pessoas maravilhosas que sempre me ajudaram a vencer os obstáculos. Eis que chegou o momento de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que direta ou indiretamente fazem parte dessa história.

- Aos meus pais, Telma e Godoy, à minha irmã, Marília, muito obrigada por seu apoio e participação em todas as decisões da minha vida. Vocês me dão asas para voar e coragem para realizar meus sonhos.
- Ao Prof. Henrique C. P. Figueiredo. Obrigada pela orientação, oportunidades, confiança, paciência, puxões de orelha, palavras de incentivo, ensinamentos...
- Thank you, merci beaucoup, danke viu mal Prof. Joachim Frey for having shared your invaluable lessons on work and life with me. It was a great honour to be part of your team.
- Aos colegas de trabalho Gláucia F. Mian, Gleí A. Carvalho-Catro, Carlos A. G. Leal, Frederico A. A. Costa, Carina O. Lopes, Lamartine Nóbrega Netto, Ulisses Pádua, Dircéia Ap. C. Custódio e Matheus O. Costa, muito obrigada pelo convívio, companheirismo e “coorientação”. À Gleí, em especial, pela enorme ajuda no meu projeto de doutorado, sem você eu não terminaria a tempo. Ao Carlos, pela inestimável ajuda no meu recurso junto ao CEPE. Ao

Matheus pelos mapas maravilhosos que ilustraram minha apresentação.

- Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, por me receber tão bem na UFMG e não medir esforços para o desenvolvimento deste projeto.
- À minha amiga Eliana Paladino (Lili), pelo companheirismo, amizade, apoio, risadas, “bobiças”, cafezinhos, florais de Bach...
- A Marias Piazza, a Guta e a Ciça, por sua valiosa amizade.
- Danke viu mal Ursula Rickli. Our friendship is a great gift.
- Às queridas professoras Lucélia Lemos e Alexandra Montes. Ao aprender novos idiomas, ampliamos nossos horizontes e descobrimos novas maneira de interpretar o mundo.
- Aos queridos tios, tias, primos e primas, pelas palavras de apoio e carinho.
- A todas as pessoas que passaram pela minha vida e deixaram um pedacinho de si.

Só aqueles que arriscam ir demasiado
longe ficarão a saber até onde podem ir"

Thomas S. Eliot

RESUMO

O *S. agalactiae* representa o principal problema de saúde no cultivo de tilápia, responsável por prejuízos em todo o mundo. A diversidade do *S. agalactiae* isolado de peixes, assim como seus fatores de virulência, ainda são pouco estudados. Tendo em vista estas considerações, este trabalho teve por objetivos estudar a diversidade genética dos *S. agalactiae* isolados de peixes por meio do sorotipo capsular e Multilocus Sequence Type, bem como investigar a relação entre diferentes perfis genéticos de virulência e a patogenicidade *in vivo*. Quarenta e um isolados de tilápia do Nilo e cinco isolados de Pintado Amazônico foram selecionados. Foi realizada a detecção dos genes de virulência: *bac*, *bca*, *bibA*, *cfb*, *cylE*, *hylB*, *gbs2018-6*, *iagA*, *lmb*, *scpB*, *fbsA* e *fbsB*. A diversidade genética foi investigada pelas técnicas de tipagem capsular e MLST. Todos os isolados obtiveram resultados positivos para os genes *iagA*, *cfb*, *gbs2018-6*, *fbsA* e *fbsB* e negativos para os genes *bac*, *bibA*, *bca* and *scpB*. Resultados variáveis foram encontrados para os genes *lmb*, *hylB* e *cylE*. Dois tipos capsulares (Ia e Ib), quatro STs (ST-103, ST-260, ST-552 e ST-553) e seis perfis de genes de virulência (I a VI) foram encontrados. Neste trabalho, pela primeira vez, foram descritos dois novos STs e o ST-103 associado a doença em peixes. Este trabalho mostra que (i) os *S. agalactiae* isolados de peixes são uma população diversa; (ii) eles são altamente virulentos e estão associados ao perfil genético de virulência e à patogenicidade *in vivo*; (iii) não há associação entre virulência, ST e sorotipo capsular.

Palavras-chave: MLST. Sorotipo capsular. Diversidade genética. Tilapia do Nilo. Patogenicidade *in vivo*.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae is one of the most important pathogen for human newborns and cultivated fish. It is the principal health problem for tilapia farming, responsible for high economic losses worldwide. Although, the diversity of *S. agalactiae* isolates and main virulence traits in fish infections is poorly understood. The goals of this work were to access the genetic patterns of fish isolates of *S. agalactiae*, by capsular serotype and MLST. Additionally, the relationship between virulence gene profiles and *in vivo* pathogenicity were addressed. Forty-six isolates from Nile tilapia and Amazon catfish were screened to the virulence genes: *bac*, *bca*, *bibA*, *cfb*, *cylE*, *hylB*, *gbs2018-6*, *iagA*, *lmb*, *scpB*, *fbsA* and *fbsB*, by PCR. The molecular capsular type and ST were determined by multiplex PCR and MLST analysis, respectively. The isolates were all positive for *iagA*, *cfb*, *gbs2018-6*, *fbsA* and *fbsB* and negative for *bac*, *bibA*, *bca* and *scpB*. Variable results were verified for *lmb*, *hylB* and *cylE*. Two capsular types (Ia and Ib), four ST (103, 260, 552 and 553) and six virulence gene profiles (I to VI) were found. Two new ST and ST 103 associated with fish disease were firstly described here. This work shows that (i) fish strains of *S. agalactiae* is a diverse population; (ii) they are highly virulent and show an association between the profile of virulence genes and the pathogenicity *in vivo*; (iii) there is no association between virulence, ST and capsular serotype.

Keywords: MLST. Capsular serotype. Genetic diversity. Nile tilapia. Pathogenicity *in vivo*.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	A aquicultura no Brasil	15
2.2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	19
2.3	Estrutura genômica e evolução genética em <i>S. agalactiae</i>	22
2.4	A doença nos peixes	26
2.5	A doença nos seres humanos e bovinos	31
2.6	Fatores de virulência de <i>S. agalactiae</i>	34
	REFERÊNCIAS	40
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	49
	ARTIGO 1 Clonality, virulence genes and pathogenicity of <i>Streptococcus agalactiae</i> strains isolated from fish	49

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor da produção animal que vem apresentando maiores taxas de crescimento nos últimos sessenta anos, passando de um milhão de toneladas na década de 1950 para 59,4 milhões em 2008, com valor estimado de US\$78,8 bilhões de dólares (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2010). No Brasil, a produção aquícola segue a tendência mundial de alta, com aumento de 43,8% na produção em 2009, sendo que o cultivo de tilápias corresponde a 39% desse total. Atualmente, são produzidas aproximadamente 416 mil toneladas/ano no país (BRASIL, 2009). Uma mudança no hábito alimentar dos consumidores, maior demanda por proteína de origem animal, disponibilidade de recursos hídricos e condições climáticas favoráveis fazem da aquicultura no país uma das melhores opções do agronegócio para os próximos anos.

Apesar do alto potencial para produção de organismos aquáticos, diversos entraves ainda desaceleram o desenvolvimento do setor no Brasil. Dentre esses, a ocorrência de surtos de doenças infecciosas tem sido um dos principais limitantes para diversos ramos da aquicultura, ocasionando sérias perdas econômicas aos produtores e, em muitos casos, inviabilizando produção. Protozoários, fungos e bactérias são os principais agentes etiológicos associados a casos de mortalidade em tilapiculturas no país.

Nos últimos cinquenta anos, as bactérias do gênero *Streptococcus* têm ganhado notoriedade como principais patógenos de peixes tropicais cultivados em todo o mundo. De maneira similar, a ocorrência de surtos de estreptococose em cultivos de tilápia tem se destacado no Brasil, sendo atualmente um desafio para a viabilidade das propriedades e empresas. Dados de literatura e da

casuística do AQUAVET - Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) reportam a ocorrência de surtos causados pela bactéria *Streptococcus agalactiae* em tilapiculturas em 11 estados Brasileiros, entre os quais se encontram os principais produtores: Ceará e Paraná (MIAN et al., 2009). Casos de infecção por essa bactéria ocasionam altas taxas de mortalidade que podem atingir até 90% do plantel (MIAN et al., 2009).

Diversos fatores de virulência envolvidos nas infecções por *S. agalactiae* em seres humanos têm sido descritos e caracterizados. Em peixes, a patogênese dos processos infecciosos causados por essa bactéria é pouco compreendida. Trabalhos prévios foram capazes de infectar experimentalmente tilápias do Nilo com *S. agalactiae* isolados de peixes, sugerindo que isolados de diferentes hospedeiros podem compartilhar fatores de virulência envolvidos na patogênese das infecções. Contudo, ainda não existem relatos dos genes de virulência do *S. agalactiae* isolados de peixes e sua contribuição nos processos infecciosos.

A sorotipagem do *S. agalactiae* é uma ferramenta epidemiológica tradicional na investigação das infecções em seres humanos. Dez tipos capsulares já foram descritos, sendo Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX (MAISEY; DORAN; NIZET, 2008; RAJAGOPAL, 2009; SLOTVED et al., 2007). A distribuição dos tipos capsulares parece estar ligada à região geográfica. Nos Estados Unidos e na Europa, os sorotipos Ia, II, III e V são os principais causadores de infecções invasivas (LUAN et al., 2005; MARTINS et al., 2007; SADOWY; MATYNIA; HRYNIEWICZ, 2010; SANTI et al., 2009). Além da sorotipagem, outras técnicas moleculares, como: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), ribotipagem, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Digestion Pattern (RDP), Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) e Multilocus Sequence Type (MLST) foram desenvolvidas para investigar

variações genéticas entre isolados bacterianos e predizer sobre a possível associação entre genótipos e a doença (NAKIB et al., 2011). O MLST é o principal método utilizado na análise epidemiológica para estudar a variabilidade genética e realizar o monitoramento de patógenos, bem como para investigação de sua estrutura populacional, clonalidade e evolução. O banco de dados gerado pelos resultados do MLST acessível pela internet (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>) é a característica chave dos esquemas de MLST (CHAN; JOLLEY, 2011). Esse banco de dados funciona como um dicionário, permitindo que isolados bacterianos sejam comparados em todo o mundo. Na epidemiologia do *S. agalactiae* isolados de seres humanos e bovinos, o MLST é considerado a técnica padrão de estudo da diversidade genética, com o estabelecimento de clones com diferentes habilidades de virulência. Para os isolados de peixes, não se conhece a variabilidade genética, virulência e se existe relação entre genótipo e virulência. Sendo assim, os objetivos desse estudo são:

- a) identificar o tipo capsular dos *Streptococcus agalactiae* isolados de peixes;
- b) avaliar a diversidade genética dos *S. agalactiae* isolados de peixes por meio da técnica de MLST;
- c) comparar a evolução genética das amostras de *S. agalactiae* de peixes com amostras de *S. agalactiae* isoladas de seres humanos e de bovinos;
- d) avaliar a ocorrência de genes de virulência já relatados para *S. agalactiae* de seres humanos e bovinos em amostras isoladas de peixes;
- e) avaliar a associação entre os genes de virulência, sorotipos capsulares e tipos genéticos observados pelo MLST;

- f) determinar a relação entre a ocorrência de genes de virulência, sorotipos capsulares, tipo genético e virulência *in vivo* para a tilápia do Nilo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A aquicultura no BRASIL

A aquicultura apresenta seis áreas principais, definidas pelos grupos de organismos cultivados: peixes de água doce, camarões marinhos, mexilhões, ostras, camarões de água doce e rãs. Segundo dados FAO (2010), nos últimos sessenta anos a aquicultura mundial passou de uma produção de um milhão de toneladas em 1950 para 59,4 milhões de toneladas em 2008. A taxa de crescimento da aquicultura mundial é de 8,8%, mas na América Latina este crescimento é ainda maior chegando a 21,3%.

No século XX, a tilápia *Oreochromis niloticus*, originária da África e do Oriente Médio, foi introduzida na maioria dos países do mundo, sendo criada em pelo menos 100 deles. É conhecida como o peixe mais importante de toda aquicultura do século XXI, devido as suas características fisiológicas, reprodutivas, genéticas e principalmente mercadológicas (FITZSIMMONS, 2000).

De 1990 até 2006, a produção de tilápia expandiu-se significativamente, tendo representado 2,93% do total da produção mundial em 2002, apresentando um crescimento médio anual de 12,2% (EL-SAYED, 2006). Em 2002, 87% da produção mundial de tilápia foram produzidas por cinco países (China, Egito, Filipinas, Indonésia e Tailândia), sendo que somente a China produziu 50% do total (EL-SAYED, 2006).

No início da década de 60, a produção de tilápia foi considerada um fator estratégico na expansão da aquicultura, sendo uma fonte de proteína animal obtida a baixo custo, fato que, aliado às suas características comerciais, tem feito com que seu cultivo comece a substituir o de vários outros peixes de água fria no mercado mundial (BRASIL, 2009).

Um dos fatores que contribuem para a expansão da tilápicultura em todo o mundo é a sua grande capacidade de se adequar aos vários sistemas de produção. A tilapicultura pode ser implementada em sistemas extensivos, com a utilização de subprodutos e/ou consorciada com outras espécies; ou sistemas intensivos de alta densidade. Desta forma, a tilápia é o peixe mais promissor para a expansão da aquicultura mundial (FITZSIMMONS, 2000).

No Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi introduzida em 1971. O cultivo da tilápia apresentou um desenvolvimento lento e somente após 1990, com a tecnologia da reversão sexual dos alevinos e o desenvolvimento das rações peletizadas, a tilapicultura se disseminou e aumentou sua produção (LOVSHIN, 2000). A produção de tilápia no Brasil apresenta um padrão de crescimento contínuo desde 1994 (Gráfico 1) e, entre os anos de 2003 a 2009, a produção de tilápia cresceu 105%, saindo de 64.857,5 t para 132.957,8 t, respectivamente. A produção de tilápia representa 39% do total pescado proveniente da piscicultura continental (BRASIL, 2009).

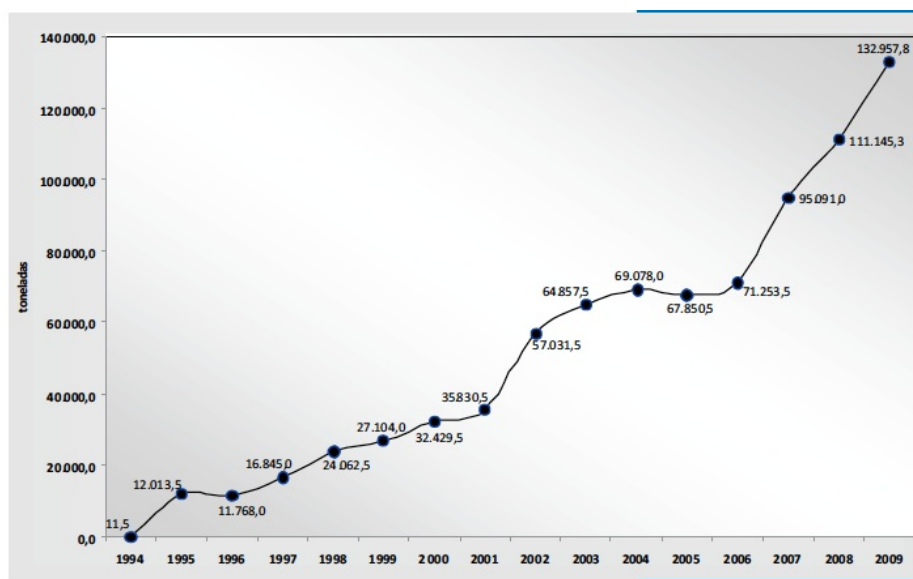


Gráfico 1 Produção de tilápia no Brasil de 1994 a 2009
Fonte: Brasil (2009)

O Brasil tem potencial para se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado. São 10 milhões de hectares de lâmina d'água em reservatórios de usinas hidrelétricas e propriedades particulares no interior do país. O Brasil possui 13,7% do total da reserva de água doce disponível no mundo. Além disso, temos 8,5 mil km de costa marítima, com 4 milhões de quilômetros quadrados de zona econômica exclusiva para pesca oceânica. A vasta gama de ambientes interiores e costeiros, somados ao clima favorável, contribui para o crescimento de diversas espécies de peixes, moluscos, crustáceos, algas, répteis e anfíbios (BRASIL, 2011a).

A FAO (2010) projeta um aumento do consumo mundial de pescado para 2030 dos atuais 16 kg/habitante/ano para 22,5 kg/habitante/ano. Isso representa um aumento de 100 milhões de toneladas/ano no consumo. No Brasil, temos 190 milhões de pessoas que consomem apenas 7 kg/habitante/ano. Contudo, este

consumo já apresenta um expressivo crescimento, sinalizando um grande potencial de mercado.

Recuperar estoques pesqueiros na costa brasileira e nas águas continentais, desenvolver a pesca oceânica e o grande potencial da aquicultura brasileira em águas da União e em estabelecimentos rurais são os objetivos do programa “Mais pesca e aquicultura”. Um Plano de desenvolvimento sustentável para os anos 2008-2011 criado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura, que prevê investimentos em diversas áreas com o objetivo de superar os entraves no desenvolvimento deste setor (BRASIL, 2011b). Fazem parte deste programa ações como estruturação da cadeia produtiva, sustentabilidade ambiental, linhas de crédito, formação profissional, incentivo ao consumo do pescado, regulamentação do uso das águas da União e sanidade aquícola entre outros.

Desde 2004, a “Instrução Normativa Interministerial N°6 de 31 de maio de 2004” estabelece as normas para a autorização de uso dos corpos d’água de domínio da União para fins de aquíicultura (BRASIL, 2011c). As águas da União são aquelas que banham mais de um Estado da Federação, fazem fronteira entre estados nacionais e com outros países. Também estão nesta condição as águas acumuladas em represas construídas com aporte de recursos da União e o Mar Territorial brasileiro, incluindo baías, enseadas e estuários, além das zonas de mar aberto. Constitucionalmente, apenas o Governo Federal pode autorizar a implantação de projetos aquícola em águas da União, através da cessão das águas, ou promover licitações para o aproveitamento destas águas em diferentes usos, entre eles a aquicultura. O reflexo desta autorização pode ser observado na Figura 1 com o considerável aumento na produção de tilápia a partir de 2005.

2.2 *Streptococcus agalactiae*

O gênero *Streptococcus* sp. é formado por cocos Gram-positivos, variando entre 0,5-0,2 μm de diâmetro, ocorrendo em pares ou cadeias quando crescem em meio líquido. São não móveis, não formam esporos e são anaeróbios facultativos. Requerem meio rico nutricionalmente para seu crescimento e algumas vezes 5% de CO_2 . Possuem metabolismo fermentativo, produzindo principalmente lactato. São catalase negativos. Comumente produzem hemolisinas, podendo os isolados serem classificados como α , β , ou não hemolíticos. Crescem em temperatura entre 25 e 45°C. As provas bioquímicas utilizadas para identificação dos isolados de *Streptococcus* contêm substratos para a detecção de atividades enzimáticas ou de fermentação de açúcares. Entre elas estão a produção de acetona, hidrólise do ácido hipúrico, hidrólise de esculina, pyrrolidonil arilamidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina, leucina aminopeptidase, arginina, ribose, arabinose, manitol, sorbitol, lactose, trealose, inulina, rafinose, amido e glicogênio. Na Tabela 1, estão listados os testes bioquímicos utilizados na identificação do *S. agalactiae* (HOLT et al., 1994).

Tabela 1 Caracterização bioquímica do *Streptococcus agalactiae*

Reação	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Voges-Proskauer	+
Hidrólise de :	
arginina	+
hipurato	+
esculina	-
Produção de ácido:	
inulina	-
manitol	-
rafinose	-
ribose	+
sorbitol	-
trealose	+
Produção de:	
fosfatase alcalina	+
α -galactosidase	-
β - galactosidase	-
pirrolidonearilaminadase	-

Fonte: Bergey's manual of determinative bacteriology (HOLT et al., 1994)

Os estreptococos podem ainda ser divididos com base nos sorogrupos dos carboidratos antigênicos, denominados grupos de Lancefield, presentes na parede celular. Estes grupos antigênicos ou grupos de Lancefield são designados por letras. Apenas o sorogrupo B corresponde a uma única espécie de estreptococo, o *Streptococcus agalactiae* (estreptococo do grupo B, GBS).

A amplificação de fragmentos de genes espécie-específicos pela técnica de PCR é uma ferramenta sensível e rápida no diagnóstico microbiológico. O gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico é ideal para investigar relações filogenéticas, segmentos deste gene são bastante conservados enquanto outros variam. As variações das sequências do 16S rDNA são espécie-específica e estáveis o suficiente para permitir inferências filogenéticas (ABDULMAWJOOD; LÄMMLER, 1999). A região espaçadora intergênica 16S-23S é utilizada em estudos comparativos de bactérias intimamente

relacionadas e se mostrou um bom alvo para o diagnóstico molecular espécie-específico (FORSMAN; TILSALA-TIMISJARVI; ALATOSSAVA, 1997). Para *Streptococcus* do grupo B, Hall, Duke e Urwin (1995) e Forsman, Tilsala-Timisjarvi e Alatosava (1997) utilizaram uma variação na região espaçadora intergênica 16S-23S para a construção de primers específicos. Desde então, esta técnica tem sido amplamente utilizada na identificação do *S. agalactiae*.

O *S. agalactiae* possui uma ampla gama de hospedeiros e seu isolamento é principalmente descrito de diferentes sítios corporais de seres humanos e da glândula mamária de ruminantes (CORRÊA et al., 2010; JOHRI et al., 2006; MAISEY; DORAN; NIZET, 2008; NARVÁEZ et al., 2004; RICHARDS et al., 2011; SUKHNANAND et al., 2005). O *S. agalactiae* foi isolado de vários outros animais como cães, cavalos, cobaia (*Cavia porcellus*), crocodilos, sapos e peixes (BISHOP et al., 2007; BROCHET et al., 2006; BRÖKER; SPELLERBERG, 2004; ELLIOTT; FACKLAM; RICHTER, 1990; EVANS et al., 2002).

Alguns dos estreptococos isolados de peixes originalmente não identificados ou erroneamente identificados como *S. difficile* foram caracterizados como grupo B não-hemolítico *S. agalactiae* (EVANS et al., 2002). O *Streptococcus difficile* é um estreptococo não-hemolítico descrito pela primeira vez em Israel, causando septicemia e meningoencefalite em fazendas de tilápia (*Oreochromis sp.*) e trutas (*Oncorhynchus mykiss*). Em 2001, estudos demonstraram que o *S. difficile* pertence ao grupo B, com o perfil eletroforético das proteínas de toda a célula, indistinguível do *S. agalactiae*. Além disso, a região intergênica 16S - 23S possui 97,7% de similaridade entre as espécies (BERRIDGE, BERCOVIER; FRELIER, 2001), permitindo a classificação como *S. agalactiae*.

2.3 Estrutura genômica e evolução genética em *S. agalactiae*

O primeiro genoma completo de um isolado de *S. agalactiae* foi publicado em 2002. A amostra sequenciada é chamada NEM316, pertence ao sorotipo III e foi isolada de um caso fatal de septicemia em neonato humano. O genoma completo da NEM316 possui 2.211.485 pares de bases, 2118 genes codificadores de proteínas e 14 ilhas de patogenicidade contendo genes de virulência e genes relacionados a elementos genéticos móveis (GLASER et al., 2002). O genoma do *S. agalactiae* revela certa similaridade com o genoma de *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*. Um mil e sessenta genes (50%) possuem homólogos nos três genomas. *S. agalactiae* compartilha 176 genes com *S. pneumoniae* e 225 com *S. pyogenes*. *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* compartilham somente 74 genes. Seiscentos e oitenta e três genes são exclusivos do *S. agalactiae*. Estes estão envolvidos em rotas metabólicas e sistemas de transporte de membrana, provavelmente relacionados à adaptação aos distintos nichos dos hospedeiros, sejam eles seres humanos ou animais. Muitos destes genes estão associados a elementos genéticos móveis, incluindo bacteriófagos e transposons, uma observação que suporta a aquisição de genes de virulência de outras espécies (TETTELIN et al., 2002).

Atualmente, já foram sequenciados quatro genomas de *S. agalactiae*, três deles isolados de infecções em seres humanos (sorotipo V e Ia) e um, isolado de mastite bovina (sorotipo III) (GLASER et al., 2002; RICHARDS et al., 2011; TETTELIN et al., 2002, 2005). A análise comparativa dos três genomas completos dos isolados de seres humanos somada ao sequenciamento parcial (“draft”) de outros cinco isolados de sorotipos adicionais levou ao conceito de que a espécie bacteriana *S. agalactiae* pode ser descrita pelo seu pan-genoma. O pan-genoma inclui um genoma central contendo os genes presentes em todos os isolados e um genoma “dispensável” composto por genes

ausentes em um ou mais isolados e genes que são únicos para cada isolado bacteriano. Surpreendentemente, mesmo após oito genomas sequenciados, genes não descritos em *S. agalactiae* ainda foram detectados. Modelos matemáticos predizem que o pan-genoma do *S. agalactiae* esta “aberto” e que novos genes continuarão a ser descritos à medida que novos isolados forem sequenciados. Em média, 33 novos genes seriam adicionados a cada novo isolado (TETTELIN et al., 2005). Os genes que são específicos de um isolado estão localizados em ilhas de patogenicidade no genoma, as quais, embora não apresentem as características clássicas de uma ilha de patogenicidade, são frequentemente flanqueadas por elementos de inserção e apresentam composição de nucleotídeos atípica, sugerindo a possibilidade de aquisição por transferência horizontal. A heterogeneidade genética entre os isolados de *S. agalactiae* evidencia que mecanismos de aquisição, duplicação e reorganização de genes levaram à diversidade genética da espécie, o que permitiu a adaptação a novos nichos de hospedeiros e o seu surgimento como um dos principais patógenos para seres humanos (TETTELIN et al., 2002).

A comparação dos genomas pode fornecer uma melhor compreensão nos processos evolutivos que influenciam as populações e espécies bacterianas e podem, por exemplo, identificar componentes do genoma que possivelmente participam na virulência e/ou adaptação ao hospedeiro e utilização de nutrientes. Um exemplo de adaptação ao hospedeiro e de utilização de nutrientes diz respeito à utilização da frutose-lactose. O sequenciamento de um isolado de bovino identificou uma ilha genômica que contém um operon envolvido na utilização da frutose e da lactose. Este operon esta ausente nos isolados de seres humanos. Richards et al. (2011) sugerem que este operon foi adquirido pelos isolados de bovino por transferência lateral (ou horizontal) de genes (LTG) com *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (bactéria que causa mastite em bovinos), pois ambos compartilham elevada semelhança. Além disso, aproximadamente

85% dos genes específicos do isolado de bovino se agruparam em 8 ilhas genômicas, sugerindo que estes genes foram adquiridos via transferência lateral de genes.

O estudo da virulência dos isolados de seres humanos e bovinos, assim como técnicas que determinassem a habilidade destes isolados de colonizar certos hospedeiros, causar doença e até mesmo cruzar barreiras interespecíes são de grande interesse na epidemiologia do *S. agalactiae*. Por essa razão, o *S. agalactiae* estimulou diversas pesquisas utilizando técnicas fenotípicas e genotípicas que estudassem a relação entre isolados de seres humanos e bovinos (CORRÊA et al., 2010). Diversas ferramentas da biologia molecular têm sido utilizadas para comparar os isolados de *S. agalactiae* de diferentes hospedeiros, entre elas estão: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), ribotipagem, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Digestion Pattern (RDP), Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) e Multilocus Sequence Type (MLST). Independentemente de como cada uma destas técnicas funciona, todas elas possuem um único objetivo final, que é o de estudar a diversidade genética dos isolados de *S. agalactiae* e prever se existe a associação entre os genótipos e a doença, ou aspectos epidemiológicos relevantes (NAKIB et al., 2011).

O Multilocus sequence type (MLST) é uma ferramenta robusta para análise epidemiológica e monitoramento de patógenos, bem como para a investigação de sua evolução e estrutura populacional (PAVÓN; MAIDEN, 2009). Atualmente, o MLST é considerado a principal ferramenta na epidemiologia molecular do *S. agalactiae*. Ela mede a variação de nucleotídeos entre sequências de DNA de um conjunto de genes constitutivos (“housekeeping”) e caracteriza as amostras pelo perfil de seus alelos. O número de genes utilizados nos esquemas de MLST (geralmente sete) depende do poder discriminatório desejado. No MLST, são utilizados sete genes para *S.*

agalactiae: *adhP* (Alcohol dehydrogenase), *pheS* (Phenylalanyl tRNA synthetase), *atr* (Amino acid transporter), *glnA* (Glutamine synthetase), *sdhA* (Serine dehydratase), *glcK* (Glucose kinase), *tkt* (Transketolase). O alelo presente para cada gene recebe um número, o número de cada alelo é designado pela ordem de seu descobrimento. A combinação dos sete alelos presentes gera um perfil (*allelic profile*) que representa um ST (sequence type). A proximidade entre isolados pode ser observada pela comparação entre os perfis de alelos (URWIN; MAIDEN, 2003). O banco de dados com todos os alelos e STs já descritos e acessível pela internet é a característica chave dos esquemas de MLST (CHAN; JOLLEY, 2011). Esses bancos de dados funcionam como dicionários que permitem que isolados bacterianos sejam comparados por todo o mundo.

O MLST expressa um número indefinido de combinações de variações alélicas. Até 11 de julho de 2011, 556 STs já haviam sido cadastradas no banco de dados. Grupos de STs que estão relacionados entre si e possuem um ancestral comum são agrupados em complexos clonais (CC) (CHAN; JOLLEY, 2011). O algoritmo BURST (Based Upon Related Sequences) é utilizado para identificar esses complexos clonais e designar o genótipo central (FEIL et al., 2004; PAVÓN; MAIDEN, 2009). STs que não se agrupam em CCs são classificadas como singletons. A identificação dos complexos clonais é uma importante ferramenta para as análises epidemiológicas (URWIN; MAIDEN, 2003). O CC 61, por exemplo, é formado por amostras de *S. agalactiae* isoladas de casos de mastite em bovinos e o CC17 é formado por isolados de meningite neonatal em seres humanos (SPRINGMAN et al., 2009). Até o momento, não foi identificado um CC formado pelos *S. agalactiae* isolado de peixes. Provavelmente, isso se deve ao pequeno número de amostras (22 isolados) já estudadas por essa técnica (BROCHET et al., 2006; EVANS et al., 2008).

2.4 A doença nos peixes

No ano de 1966, nos Estados Unidos, Robinson e Meyer (1966) descreveram o primeiro isolamento de *S. agalactiae* causando doença em peixe. Desde então, o número de isolamentos de *S. agalactiae* em peixes vem aumentando em diversas regiões geográficas. Hoje, já existem relatos de isolamento do *S. agalactiae* nos Estados Unidos, Kuwait, Israel, Brasil, Bélgica, Honduras, Tailândia, Malásia e Iran (DUREMDEZ et al., 2004; EVANS et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2006; MIAN et al., 2009; PLUMB et al., 1974; POURGHOLAM et al., 2011; ROBINSON; MEYER, 1966; SALVADOR et al., 2003, 2005; SUANYUK et al., 2008; ZAMRI-SAAD; AMAL; SITI-ZAHRAH, 2010). Dentre as espécies acometidas, estão os peixes marinhos *Notemigonus crysoleucas*, *Pampus argenteus*, *Sparus auratus* e *Liza klunzingeri* (EVANS et al., 2002; DUREMDEZ et al., 2004; PLUMB et al., 1974; ROBINSON; MEYER, 1966) e os peixes de água doce *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aurea* X *O. niloticus* e *Oncorhynchus mykiss* (FIGUEIREDO et al., 2006; POURGHOLAM et al., 2011; SALVADOR et al., 2003, 2005; MIAN et al., 2009)

As infecções por *S. agalactiae* em peixes estão associadas a uma morbidade e mortalidade significativas. A patogênese envolve septicemia e colonização de diversos órgãos, como nadadeiras, cérebro, rins e intestinos. Os sinais clínicos incluem depressão ou excitabilidade, anorexia, postura corporal em forma de ‘C’, natação errática, natação em turbilhão e em círculos na superfície, e morte. As anormalidades oculares incluem opacidade, hemorragia periorbital e intraocular, purulência e exoftalmia. Hemorragia e avermelhamento são achados comuns no sistema tegumentar e músculo-esquelético. Áreas hemorrágicas são encontradas cranialmente e na superfície do corpo, principalmente ao redor da boca, opérculo e nadadeiras (EVANS et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2006; MIAN et al., 2009; PASNIK et al., 2005; ZAMRI-

SAAD; AMAL; SITI-ZAHRAH, 2010). Em casos superagudos, esses podem não se manifestar, sendo verificada apenas a ocorrência da mortalidade (EVANS et al., 2002; MIAN et al., 2009).

Provavelmente, a transmissão do *S. agalactiae* entre peixes está relacionada ao contato entre carreadores ou peixes infectados (EVANS et al., 2002; MIAN et al., 2009). Surtos com considerável mortalidade estão associados a vários fatores de risco como o aumento da temperatura da água (acima de 27°C), manejo intensivo, aumento dos níveis de amônia e baixos níveis de oxigênio dissolvido, além de altas densidades de estocagem (MIAN et al., 2009; PASNIK et al., 2005).

A Figura 1 ilustra o avanço do *S. agalactiae* no Brasil. No Brasil, o primeiro relato da ocorrência dessa doença ocorreu no ano de 2003, quando foram identificados surtos de estreptococoses (*Streptococcus* sp.) em tilapiculturas em quatro propriedades no Norte do Paraná (SALVADOR et al., 2003). Os principais sinais clínicos observados foram lesão na pele e na base das nadadeiras e exoftalmia com opacidade de córnea. A ocorrência da doença foi associada aos períodos do ano que apresentam temperatura elevada. Em 2005, Salvador et al. (2005) realizaram um trabalho de caracterização dos *Streptococcus* sp isolados em tanques de terra e viveiros escavados na região norte do Paraná. Estes isolados foram identificados como *Streptococcus* do grupo B. No ano de 2006, Figueiredo e colaboradores relataram o isolamento e a caracterização de *S. agalactiae* em pisciculturas localizadas nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. As características relevantes observadas em ambas as criações foram escurecimento dos peixes, exoftalmia bilateral ou unilateral em alguns animais, pequenas lesões de pele com perda de escamas e áreas de petéquias na base das nadadeiras ventrais, natação errática e em movimentos circulares, alta mortalidade. Evolução rápida, seguida de morte dois a três dias após o início dos sinais clínicos.

Mian et al. (2009) estudaram a epidemiologia, transmissão e virulência dos *S. agalactiae* isolados de nove fazendas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Paraná, São Paulo e Ceará, que apresentaram surtos de meningoencefalite e septicemia em tilápia do Nilo. Os dados coletados nessas propriedades revelaram que os surtos ocorreram quando a temperatura da água estava acima de 26°C. Ensaio de infecção experimental com cinco amostras de diferentes origens geográficas demonstraram que todas elas foram altamente virulentas, apresentando valores de DL50 (dose letal 50%) menores que 90 bactérias. Além disso, a doença clínica causada pelo *S. agalactiae* foi reproduzida em ensaios por diferentes vias de infecção, quais foram: imersão em suspensão bacteriana, inoculação das brânquias e coabitação de peixes saudáveis e doentes.

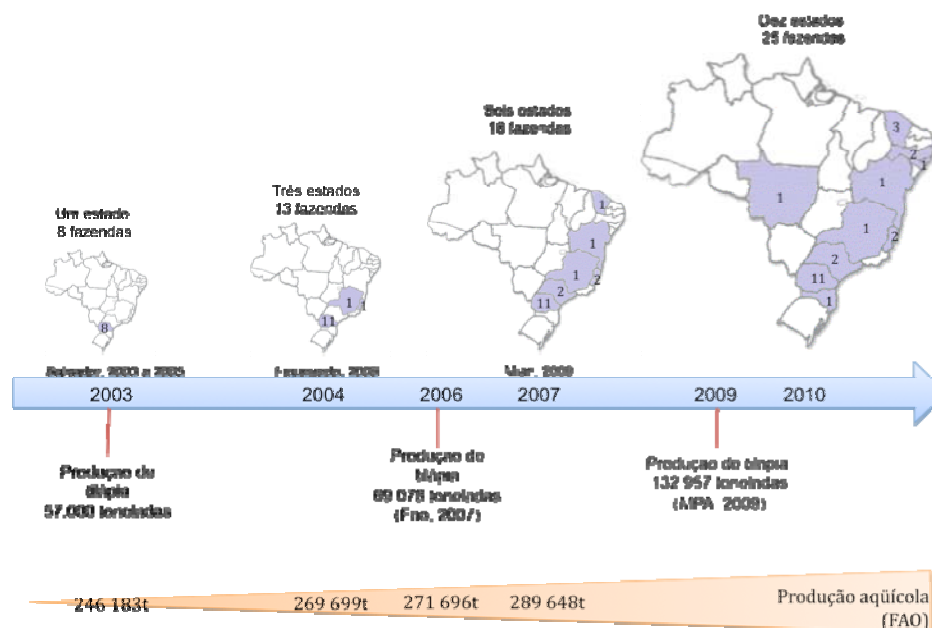


Figura 1 Evolução dos surtos de estreptococose em tilápia do Nilo nos diferentes estados brasileiros e aumento da produção de tilápias no Brasil e no Mundo. O número dentro dos estados representa o número de fazendas em que *S. agalactiae* foi isolado e identificado

Ensaio de infecção experimental por *S. agalactiae* já foram realizados para diversas espécies de peixes e diferentes vias de infecção. Robinson e Meyer (1966) induziram a mortalidade em peixes dourados (*Notemigonus crysoleucas*) por coabitação, imersão e injeção por via intraperitoneal ou intramuscular. Ainda, por via intramuscular, foi reproduzida a doença em *Lepomis macrochirus* e *L. cyanellus*. Tilápias foram susceptíveis à infecção experimental com isolados de *S. agalactiae* pela via intraperitoneal, imersão e coabitação (ELDAR; BEJERANO; BERCOVIER, 1994; ELDAR et al, 1995; MIAN et al., 2009). Ao caracterizar isolados de *S. agalactiae* oriundos de um surto de grandes proporções de mortalidade no golfo do Kuwait, Evans et al. (2002) induziram a infecção em tilápia do Nilo e relataram a ocorrência de amostras com diferentes

intensidades de virulência, sendo determinada a DL50 para um isolado, de $1.9 \times 10^{3.3}$ UFC (unidades formadoras de colônias). A partir desse isolado de maior virulência, foi desenvolvida uma vacina experimental, que se mostrou eficiente quando administrada por via intraperitoneal (EVANS; KELSIUS; SHOEMAKER, 2004).

No Brasil, não existem vacinas licenciadas para uso em piscicultura e o principal método para controlar o *S. agalactiae* nas pisciculturas é a antibioticoterapia oral dos peixes. O uso do antibiótico por via oral evita a ocorrência da doença nos peixes não infectados, debela as infecções dos casos que se encontram em estágio inicial e dos portadores assintomáticos. Porém, não cura os peixes que já apresentam anorexia como sinal clínico, o que pode levar ao insucesso da terapia (HEUER et al., 2009; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2009).

Devido à importância das infecções por *S. agalactiae* em seres humanos, diversos fatores de virulência e os mecanismos envolvidos na patogênese da doença em mamíferos têm sido descritos e caracterizados (RAJAGOPAL, 2009). Em peixes, a patogênese dos processos infecciosos causados por essa bactéria é pouco compreendida. Em condições experimentais, amostras isoladas de seres humanos foram capazes de infectar tilápias do Nilo (EVANS et al., 2008; PEREIRA et al., 2010). Esses dados sugerem que isolados de diferentes hospedeiros podem compartilhar fatores de virulência e mecanismos de invasão envolvidos na patogênese das infecções.

Diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas na tipificação dos *S. agalactiae* isolados de seres humanos, bovinos e peixes. Apesar de ser a mesma espécie bacteriana, as amostras isoladas de peixes apresentam padrão genético distinto das isoladas de seres humanos e de bovinos (BROCHET et al., 2006; OLIVARES-FUSTER et al., 2008; PEREIRA et al., 2010). A diversidade dos *S. agalactiae* isolados de peixes no Kuwait, Estados Unidos, Honduras, Israel e

Brasil foi estudada pelas técnicas de AFLP e MLST. Ambos os testes encontraram uma diversidade entre os *S. agalactiae* isolados de diferentes origens geográficas, com associação entre o tipo genético do *S. agalactiae* e sua origem (EVANS et al., 2008; OLIVARES-FUSTER et al., 2008).

Não existem trabalhos prévios que estudem a virulência do *S. agalactiae* isolados de peixes. Assim como não existem trabalhos que analisem dados de tipificação genética de *S. agalactiae* isolados de peixes juntamente com a virulência com o objetivo de prever se existe relação entre genótipo e doença.

2.5 A doença nos seres humanos e bovinos

O *S. agalactiae* é um importante patógeno de seres humanos, responsável por causar significativas patologias no neonato e nas mulheres durante o parto (NARVÁEZ et al., 2004; RAJAGOPAL, 2009). É uma importante causa de bacteremia e meningite no neonato, assim como infecções maternas, tais como corioamnionite, endometrite pós-parto, infecções do trato urinário e bacteremia (JOHRI et al., 2006; NARVÁEZ et al., 2004). A colonização materna é o principal fator de risco para a doença no neonato. Aproximadamente 20 a 40% das mulheres grávidas são positivas para a colonização pelo *S. agalactiae* (SPRINGMAN et al., 2009).

Nos Estados Unidos, o número de casos de septicemia em neonatos foi estimado em 0,3 a cada 1000 nascidos vivos. Nos países europeus, esta taxa varia entre 0,24 e 1,26 para 1000 nascidos vivos (JOHRI et al., 2006; SPELLERBERG, 2000). Os neonatos podem ser infectados com o *S. agalactiae* “*in utero*”, devido a uma infecção ascendente, durante o parto, aspirando fluidos vaginais contaminados, ou, em menor frequência, durante a amamentação (GLASER et al., 2002; LEWIS; NIZET; VARKI, 2004; MAGALHÃES et al., 2007; SPELLERBERG, 2000). A infecção pode se manifestar nas primeiras

horas de vida (6-8 horas), apresentando falência respiratória, bacteremia e choque séptico. Nestes casos, ela é denominada como “early-onset disease” (EOD). Outra apresentação clínica da doença é a meningite que acomete os bebês com alguns meses de vida (até 7 meses), denominada “late-onset diseases” (LOD), ocasionando altas taxas de mortalidade ou consequências neurológicas severas (DORAN; NIZET, 2004; MAISEY; DORAN; NIZET, 2008; RAJAGOPAL, 2009).

Em adultos, *S. agalactiae* ocorre preferencialmente em pessoas com mais de 60 anos ou pessoas imunocomprometidas. A apresentação clínica inclui: bacteremia primária, pneumonia, infecção do trato urinário, peritonite, endocardite, osteomielite e infecções de pele e tecidos moles (DEL POZO et al., 2000; JOHRI et al., 2006; NARVÁEZ et al., 2004). Fatores de risco na população adulta incluem diabetes, doenças cardiovasculares, hepatite e câncer (JOHRI et al., 2006). Além disso, os seres humanos são reservatório da bactéria e estima-se que cerca de 20 a 30% das mulheres em idade fértil são portadoras vaginais assintomáticas do *S. agalactiae* (LEWIS; NIZET; VARKI, 2004; MARTINEZ et al., 2000).

A técnica de MLST tem sido amplamente utilizada nos estudos populacionais dos *S. agalactiae* isolados de seres humanos com o objetivo de caracterizar as populações desta bactéria, presentes nas infecções neonatais e/ ou na microbiota vaginal. Os principais STs dos *S. agalactiae* isolados de seres humanos são ST-1, ST-12, ST-17, ST-19, ST-23 (BOHSACK et al., 2008; MANNING et al., 2009; SPRINGMAN et al., 2009). Dentre estes STs, a maioria das doenças invasivas nos neonatos e praticamente todos os casos de meningite são causados por isolados de *S. agalactiae* classificados no ST-17, conhecidos como “clones hipervirulentos” (JONES et al., 2003; LAMY et al., 2006). Dentre os *S. agalactiae* isolados na microbiota vaginal, os STs

pertencentes aos CC-1 e CC-23 são os mais frequentes (MANNING et al., 2009).

Nos bovinos, o *S. agalactiae* é um importante agente das infecções clínicas e subclínicas da glândula mamária (mastite), ocasionando elevadas perdas econômicas na produção de leite e derivados (CORRÊA et al., 2010; RICHARDS et al., 2011; SUKHNANAND et al., 2005). Nos Estados Unidos, estima-se que as perdas anuais da indústria leiteira são superiores a dois bilhões de dólares devido à mastite (RICHARDS et al., 2011). Células bacterianas são liberadas, dos tetos infectados, no leite e a transmissão para os tetos não infectados, assim como para outros animais, acontece durante a ordenha (DUARTE et al., 2004).

A disponibilidade de informação sobre a prevalência e características epidemiológicas do *S. agalactiae* isolado dos bovinos é essencial para a elaboração de programas de controle. A caracterização deste isolado pela técnica de MLST demonstrou que os principais STs dos *S. agalactiae* isolados dos bovinos pertencem ao CC 61 (ST-61, ST-91, ST-76), um CC formado exclusivamente por *S. agalactiae* isolados de bovinos (SPRINGMAN et al., 2009).

A vasta gama de hospedeiros do *S. agalactiae* e diferenças fenotípicas entre os *S. agalactiae* isolados de seres humanos e bovinos levantam a questão sobre a origem destas populações. As relações de clonalidade e ancestralidade entre os *S. agalactiae* isolados de seres humanos e de bovinos é bastante controversa. Comparações feitas pelas técnicas de PFGE e ribotipagem sugerem que as populações isoladas de seres humanos e de bovinos pertencem a grupos distintos (SUKHNANAND et al., 2005). Entretanto, resultados de MLST mostram uma relação clonal entre os *S. agalactiae* isolados de seres humanos pertencentes ao grupo ST-17 e os isolados de mastite bovina, sugerindo um ancestral comum entre eles (LAMY et al., 2006). Estudando a emergência e

disseminação de clones hospedeiro específico do *S. agalactiae*, Sorensen et al. (2010) utilizam um novo esquema de MLST, baseado em 15 genes (7 genes do MLST regular somados a outros 8 genes). Neste trabalho, os resultados demonstram que os *S. agalactiae* isolados de seres humanos e de bovinos são populações distintas e o clone hipervirulento ST-17 não possui relação de ancestralidade com um isolado de bovino.

Em seu trabalho sobre genômica comparativa e evolução do *S. agalactiae* isolado de bovino, Richards et al. (2011) concluíram que os *S. agalactiae* isolado de seres humanos e de bovinos pertencem a populações distintas. A transferência de elementos genéticos móveis entre bactérias causadoras de mastite incorporou potenciais genes de virulência ao *S. agalactiae* “bovino-específico” que continuamente se adaptaram ao hospedeiro. O principal fator responsável pela distinção entre populações de *S. agalactiae* foi essa troca de elementos genéticos móveis relacionados à virulência ou a novas rotas metabólicas.

2.6 Fatores de virulência de *S. agalactiae*

O desenvolvimento da doença causada pelo *S. agalactiae* reflete o sucesso da adesão e penetração das barreiras epiteliais/ endoteliais e resistência ao sistema imune, permitindo sua sobrevivência na corrente sanguínea e, nos casos de meningite, a habilidade de vencer a barreira hemato-encefálica (BHE). Para vencer todas essas barreiras, o *S. agalactiae* expressa diversos fatores de virulência associados à superfície bacteriana ou que são secretados no meio. Estes fatores de virulência são responsáveis por mediar as interações da bactéria com as células hospedeiras, além de influenciar os mecanismos da resposta imune (DORAN; NIZET, 2004; MAISEY; DORAN; NIZET, 2008; RAJAGOPAL, 2009). A tabela 2 sumariza esses fatores.

Tabela 2 Principais fatores de virulência do *S. agalactiae* isolado de seres humanos já descritos e seus respectivos modos de ação e genes

Fatores de Virulência	Gene	Modo de Ação
Toxina formadora de poro		
β-hemolisina/ citolisina	<i>cylE</i>	Lise da célula do hospedeiro, induz resposta inflamatória e apoptose
fator CAMP	<i>cfb</i>	Forma poros na membrana da célula do hospedeiro
Fatores de evasão do sistema imune		
Cápsula rica em ácido siálico	<i>cpsA-L</i>	Mimetiza o ácido siálico da célula do hospedeiro e previne o reconhecimento pelo sistema imune
Superóxido dismutase (SodA)	<i>sodA</i>	Proteção dos radicais de oxigênios e superóxidos
Pigmento	<i>cyl locus</i>	Proteção dos radicais de oxigênios e superóxidos
C5a peptidase (ScpB)	<i>scpB</i>	Cliva a subunidade C5a do sistema complemento e promove a aderência à fibronectina da matriz extracelular.
Serine protease (CspA)	<i>cspA</i>	Cliva fibrinogênio e quimiocinas
Aderência e invasão		
Proteína ligadora ao fibrinogênio A (FbsA)	<i>fbsA</i>	Promove a aderência do GBS às células do hospedeiro se ligando ao fibrinogênio da matriz extracelular
Proteína ligadora ao fibrinogênio B (FbsB)	<i>fbsB</i>	Promove a entrada do GBS nas células do hospedeiro
Proteína ligadora à laminina (Lmb)	<i>lmb</i>	Promove a aderência do GBS à laminina da célula do hospedeiro
Proteína serine-rich repeat (Srr)	<i>srr-1/ srr-2</i>	Srr-1 promove aderência às células epiteliais e Srr-2 aumenta a virulência do GBS
Adesina bacteriana imunogênica (BibA)	<i>bibA</i>	Promove a aderência do GBS às células do hospedeiro e se liga ao fator C4b do sistema complemento
Proteína C	<i>bca/bac</i>	Facilita a aderência do GBS às células epiteliais
Gene associado à invasão	<i>iagA</i>	Invasão da barreira hemato-encefálica
Outros fatores		
Hyaluronato lisase	<i>hylB</i>	Cliva o ácido hialurônico e promove a disseminação de GBS
<i>gbs2018-6</i>		Desconhecido

Fonte: adaptado de Rajagopal (2009)

A primeira proteína de superfície identificada do *S. agalactiae* foi o antígeno C. A posterior caracterização deste antígeno mostrou que ele era formado por dois componentes não relacionados entre si: as proteínas α (*bca*) e β (*bac*) (LINDAHL; STALHAMMAR-CARLEMALM; ARESCHOUG, 2005). Isolados de *S. agalactiae* podem expressar uma ou ambas subunidades ou ainda nenhuma delas. A presença do antígeno C é verificada nos sorotipos Ia, Ib e II (BRÖKER; SPELLERBERG, 2004). Amostras de *S. agalactiae* do sorotipo III isoladas de seres humanos não expressam nenhuma de suas subunidades. A importância do antígeno C para a virulência do *S. agalactiae* ainda é controversa, pois seu efeito em ensaios de invasão é pequeno ou nulo. Contudo, os componentes da proteína C são alvos para produção de anticorpos (LINDAHL; STALHAMMAR-CARLEMALM; ARESCHOUG, 2005).

Os polissacarídeos capsulares (*cpsA-L*) são considerados o principal fator de virulência do *S. agalactiae* e auxiliam o microrganismo na evasão do sistema imune do hospedeiro. Existem dez tipos de CPS, são eles: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX (BROCHET et al., 2006; JOHRI et al., 2006; SLOTVED et al., 2007). A prevalência dos tipos capsulares está relacionada à região geográfica em que a bactéria foi isolada. Nos Estados Unidos, Austrália e Europa, cerca de 80% a 90% dos isolados de casos clínicos são tipificáveis como Ia, II, III e V, enquanto no Japão, os mais comuns são VI e VIII (KONG et al., 2008). A cápsula de todos os *S. agalactiae* possui ainda uma ligação terminal 2-3 com ácido siálico [ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac)], que impede a ativação do sistema complemento do hospedeiro (LEWIS; NIZET; VARKI, 2004).

As toxinas formadoras de poro promovem a entrada do patógeno na célula hospedeira, facilitam a sua sobrevivência intracelular e disseminação sistêmica. Duas dessas toxinas estão presentes no *S. agalactiae*, β -hemolisina/citolisina (β -H/C) e Fator Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)

(RAJAGOPAL, 2009). O fator CAMP lisa a membrana dos eritrócitos e interage com a porção Fc das imunoglobulinas IgG e IgM de seres humanos (SPELLERBERG, 2000). β -H/C, também nomeada CylE, promove a invasão do GBS nas células do hospedeiro, principalmente as epiteliais, endoteliais pulmonares e células da Barreira Hemato-Encefálica (BHE). O gene *cylE* é o componente essencial à biossíntese da β -H/C, sendo os genes *cylK* e *cylJ* importantes cofatores (PRITZLAFF et al., 2001). Infecções experimentais em ratos neonatos com mutantes para os genes *cylE*, *cylK* e *cylJ* causaram menores taxas de mortalidade em relação à bactéria tipo selvagem (wild-type), sendo que o mutante Δ *cylE* foi o menos virulento em relação aos demais testados (FORQUIN et al., 2007).

Tenenbaum et al. (2007) demonstraram que a capacidade de *S. agalactiae* invadir as células do endotélio microvascular do cérebro depende dos genes *scpB-lmb*. Os genes *scpB* e *lmb* codificam a peptidase C5a e a lipoproteína ligadora de laminina (Lmb), respectivamente. A C5a peptidase (ScpB) codificada pelo gene *scpB* é uma serina protease que facilita a evasão do sistema imune. Ela cliva e inativa o componente C5a do complemento, assim como promove a ligação nas células epiteliais e à fibronectina da matriz extracelular (CHENG et al., 2002; MAISEY; DORAN; NIZET, 2008; RAJAGOPAL, 2009). Em seres humanos, a ligação da bactéria à laminina é mediada pela Lmb, que se expressa na maioria dos *S. agalactiae* isolados de casos clínicos em seres humanos (SPELLERBERG et al., 1999). A deleção dos genes *scpB-lmb* prejudica a aderência e a invasão das células hospedeiras pelo patógeno, confirmando o papel da Lmb como uma invasina.

Doran et al. (2005) identificaram um gene associado à invasão, o gene *iagA*, que codifica um glicolípido conhecido como diglucosildiacilglicerol. Ratos infectados com mutantes sem o gene *iagA* desenvolveram bacteremia de maneira similar às bactérias que possuíam este gene. Contudo, o mutante sem

iagA apresentou menor penetração da barreira hemato-encefálica e meningite quando comparado ao isolado isogênico do tipo selvagem. O glicolípido diglucosildiacilglicerol uma âncora na parede celular para o ácido lipoteicóico (LTA) está ausente no mutante *ΔiagA*. Neste mutante, o LTA é liberado no meio de cultura e é capaz de inibir a invasão da BHE pelo *S. agalactiae* do tipo selvagem. Os autores sugerem que a expressão do LTA na superfície do *S. agalactiae* participa na interação com o endotélio da BHE e, conseqüentemente, na patogênese da meningite.

Uma adesina imunogênica com atividade antifagocítica nomeada BibA foi identificada após o sequenciamento dos genomas de *S. agalactiae*. A adesina BibA é expressa na superfície da célula bacteriana e se liga à proteína ligadora de C4 (C4-binding protein), um regulador da via clássica do complemento. A deleção do gene *bibA* reduz a capacidade do patógeno sobreviver na corrente sanguínea, resistir à opsonização e fagocitose, além de prejudicar a aderência às células do hospedeiro (SANTI et al., 2007). BibA é codificada por um dos alelos do gene *gbs2018*, até o momento 6 alelos já foram descritos. Existe uma adaptação deste alelo ao hospedeiro, o alelo 5, por exemplo, que é encontrado somente em isolados de bovinos e o alelo 6, identificado em isolado de uma truta (BROCHET et al., 2006; SPRINGMAN et al., 2009). A contribuição de cada variante para a patogênese do GBS é ainda pouco compreendida.

Também conhecida como hialuronidase (HylB), a protease codificada pelo gene *hylB* é secretada pelo GBS e atua ativamente no processo de patogênese das infecções. A hialuronidase cliva o ácido hialurônico, principal componente do tecido conectivo, e facilita a disseminação da bactéria no organismo (SPELLERBERG, 2000). Algumas amostras com atividade ausente da hialuronidase apresentam uma sequência de inserção, designada *ISI548*, interrompendo o gene *hylB*, sendo, conseqüentemente, menos virulentas (YILDIRIM; FINK; LÄMMLER, 2002).

A ligação da bactéria ao fibrinogênio é mediada pelas proteínas ligadoras de fibrinogênio FbsA e FbsB. As proteínas FbsA e FbsB se ligam tanto ao fibrinogênio em solução como ao fibrinogênio imobilizado na superfície celular. Mutantes sem o gene *fbSA* apresentaram reduzida ligação ao fibrinogênio e maior sensibilidade à fagocitose quando comparados às amostras selvagens. Em contraste ao FbsA, mutantes sem *fbSB* não tiveram sua capacidade de ligação ao fibrinogênio atenuada, mas a capacidade de invasão das células epiteliais foi severamente prejudicada (RAJAGOPAL, 2009; SCHUBERT et al., 2002). Estes dados sugerem que FbsA é responsável pela aderência à célula hospedeira e que FbsB promove a invasão.

A identificação das proteínas de superfície, somada à sorotipagem da cápsula permite a subdivisão do GBS em diversos variantes. Essa pode facilitar o estudo da sua epidemiologia, patologia e outros assuntos relacionados à infecção. Para os estudos de epidemiologia e patogênese, é interessante identificar o maior número possível de marcadores fenotípicos e moleculares, pois esta identificação aumenta o poder discriminatório dos sistemas de tipificação (KONG et al., 2002). Adicionalmente, a prospecção de fatores de virulência podem direcionar o desenvolvimento de vacinas.

REFERÊNCIAS

ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C. Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of streptococci of Lancefield group B. **Research in Veterinary Science**, London, v. 67, n. 2, p. 157-160, Oct. 1999.

BERRIDGE, B. R.; BERCOVIER, H.; FRELIER, P. F. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 165-173, Jan. 2001.

BISHOP, E. J. et al. Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature. **Epidemiology and Infections**, Cambridge, v. 135, n. 8, p. 1248-1255, Nov. 2007.

BOHNSACK, J. F. et al. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. academic centers from 1995 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 1285-1291, Apr. 2008.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Estatística da pesca e aqüicultura**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/#info-estatistica/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>>. Acesso em: 1 jun. 2011a.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Planos e políticas: mais pesca e aqüicultura**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#planos_e_politicas/mais-pesca-aquicultura>. Acesso em: 1 jun. 2011b.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção pesqueira e aquícola**. Brasília, 2009. 30 p.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Instrução Normativa Interministerial n. 6** de 31 de maio de 2004. Estabelece as normas para a autorização de uso dos corpos d'água de domínio da União para fins de aqüicultura. Disponível em: <http://www.planejamento.gov.br/secretarias/upload/Legislacao/Instrucao_Normativa/040531_IN_inter_06.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2011c.

BROCHET, M. et al. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 5, p. 1227-1243, Apr. 2006.

BRÖKER, G.; SPELLERBERG, B. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and horizontal gene transfer. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 294, n. 2/3, p. 169-175, Sept. 2004.

CHAN, M. S.; JOLLEY, K. **Streptococcus agalactiae (group B streptococcus GBS) MLST Database**. Disponível em: <<http://pubmlst.org/sagalactiae/>>. Acesso em: 1 jul. 2011.

CHENG, Q. et al. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n. 5, p. 2408-2413, May 2002.

CORRÊA, A. B. A. et al. Virulence characteristics of genetically related isolates of group B streptococci from bovines and humans. **Veterinary Microbiology**, London, v. 143, n. 2/4, p. 429-433, July 2010.

DEL POZO, J. S. G. et al. Vertebral osteomyelitis caused by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Infection**, London, v. 41, n. 1, p. 84-90, July 2000.

DORAN, K. S. et al. Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 115, n. 9, p. 2499-2507, Sept. 2005.

DORAN, K. S.; NIZET, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 54, n. 1, p. 23-31, Oct. 2004.

DUARTE, R. S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brasil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 9, p. 4214-4222, Sept. 2004.

DUREMDEZ, R. et al. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 307-310, May 2004.

EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. Cambridge: Cambridge University, 2006. 277 p.

ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology**, New York, v. 28, n. 3, p. 139-143, Mar. 1994.

ELDAR, A. et al. Experimental meningoencephalitis in cultured fish. **Veterinary of Microbiology**, London, v. 43, n. 1, p. 33-40, Jan. 1995.

ELLIOTT, J. A.; FACKLAM, R. R.; RICHTER, C. B. Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, Streptococci isolated from humans, mice, cattle, frog and fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 628-630, Mar. 1990.

EVANS, J. J. et al. Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 505-513, Sept. 2002.

EVANS, J. J. et al. Phylogenetic relationship among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 57, n. 11, p. 1369-1376, Nov. 2008.

EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, Kidlington, v. 22, n. 27/28, p. 3769-3773, Sept. 2004.

FEIL, E. J. et al. eBurst: inferring patterns of evolutionary descent among cluster of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 5, p. 1518-1530, Mar. 2004.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 678-680, ago. 2006.

FITZSIMMONS, K. The most important aquaculture species of the 21-century. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., 2000, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Panorama da Aquicultura, 2000. p. 3-8.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS . **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2010. 197 p.

FORQUIN, M. P. et al. The putative glycosyltransferase-encoding gene *cylj* and the group B *Streptococcus* (GBS) specific gene *cylk* modulate hemolysin production and virulence of GBS. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p. 2063-2066, Apr. 2007.

FORSMAN, P.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology**, Reading, v. 143, n. 11, p. 3491-3500, Nov. 1997.

GLASER, P. et al. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 45, n. 6, p. 1499-1513, Sept. 2002.

HALL, L. M. C.; DUKE, B.; URWIN, G. An approach to the identification of the pathogens of bacterial meningitis by the polymerase chain reaction. **European Journal of Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 14, n. 12, p.1090-1094, Dec. 1995.

HEUER, O. E. et al. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, n. 8, p. 1248-1253, Oct. 2009.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 532 p.

JOHRI, A. K. et al. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 12, p. 932-942, Dec. 2006.

JONES, N. et al. Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 6, p. 2530-2536, June 2003.

KONG, F. et al. Molecular profiles of group B streptococcal surface proteins antigen genes: relationship to molecular serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 620-626, Feb. 2002.

KONG, F. et al. Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 8, p. 2745-2750, Aug. 2008.

LAMY, M. C. et al. Rapid detection of the 'highly virulent' group B streptococcus ST-17 clone. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 7, p. 1714-1722, June 2006.

LEWIS, A. L.; NIZET, V.; VARKI, A. Discovery and characterization of sialic acid O-acetylation in group B *Streptococcus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 30, p. 11123-11128, July 2004.

LINDAHL, G.; STALHAMMAR-CARLEMALM, M.; ARESCHOUG, T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. **Clinical Microbiological Review**, Washington, v. 18, n. 1, p. 102-127, Jan. 2005.

LOVSHIN, L. L. Tilapia culture in Brazil. 133-140. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Ed.). **Tilapia aquaculture in the Americas**. Baton Rouge: The Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 1333-140.

LUAN, S. L. et al. Multilocus sequence typing of swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 8, p. 3727-3733, Aug. 2005.

MAGALHÃES, V. et al. Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in *Streptococcus agalactiae* and enhances its virulence in a mouse model. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 11, p. 1276-1284, Sept. 2007.

MAISEY, H. C.; DORAN, K. S.; NIZET, V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. **Expert Reviews Molecular Medicine**, Cambridge, v. 10, n. 27, p. 1-16, Sept. 2008.

MANNING, S. D. et al. Multilocus sequence type associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1143-1148, Apr. 2009.

MARTINEZ, G. et al. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 71-78, Jan. 2000.

MARTINS, E. R. et al. Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 10, p. 3224-3229, Oct. 2007.

MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, London, v. 136, n. 1/2, p. 180-183, Apr. 2009.

NAKIB, M. et al. Comparison of the Diversilab® system with multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus agalactiae* invasive strains. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 137-142, May 2011.

NARVÁEZ, J. et al. Group B streptococcal spondylodiscitis in adults: 2 case reports. **Joint Bone Spine**, Paris, v. 71, n. 4, p. 338-343, July 2004.

OLIVARES-FUSTER, O. et al. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 277-283, Apr. 2008.

PASNIK, D. J. et al. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 205-212, Apr. 2005.

PAVÓN, A. B. I.; MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing. In: CAUGANT, D. A. **Molecular epidemiology of microorganisms**. Clifton: Humana Press, 2009. chap. 11, p. 129-140. (Methods in Molecular Microbiology, v. 551).

PLUMB, J. A. et al. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 103, n. 2, p. 358-361, 1974.

PEREIRA, U. P. et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia.

Veterinary Microbiology, London, v. 140, n. 1/2, p. 186-192, Jan. 2010.

POURGHOLAM, R. et al. Distribution and molecular identification of some causative agents of streptococcosis isolated from farmed rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Iran. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, Tehran, v. 10, n. 1, p. 109-122, Jan. 2011.

PRITZLAFF, C. A. et al. Genetic basis for the β -hemolytic/ citolytic activity of Group B *Streptococcus*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 39, n. 2, p. 236-247, Jan. 2001.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiology**, London, v. 4, n. 2, p. 201-221, Mar. 2009.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, n. 5, p. 579-582, May 2009.

RICHARDS, V. P. et al. Comparative genomics and the role of lateral transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 6, p. 1263-1275, Aug. 2011.

ROBINSON, J. A.; MEYER, F. P. Streptococcal fish pathogen. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 92, n. 2, p. 512, Aug. 1966.

SALVADOR, R. et al. Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp. do grupo B em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na região norte do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, 1374-1378, nov./dez. 2005.

SALVADOR, R. et al. Isolation of *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and quality of water in hapas nets in North Region of Parana State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, jan./jun. 2003.

SADOWY, E.; MATYNIA, B.; HRYNIEWICZ, W. Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, n. 9, p. 1907-1914, June 2010.

SANTI, I. et al. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 63, n. 3, p.754-767, Feb. 2007.

SANTI, I. et al. BibA induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B *Streptococcus*. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 200, n. 4, p. 564-570, Aug. 2009.

SCHUBERT, A. et al. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 2, n. 2, p. 557-569, Oct. 2002.

SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 9, p. 2929-2936, Sept. 2007.

SORENSEN, U. B. S. et al. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. **mBio**, Washington, v. 1, n. 3, p.178, July/ Aug. 2010.

SPELLERBERG, B. et al. Lmb, a protein with similarities to the Lra1 adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 2, p. 871-878, Feb. 1999.

SPELLERBERG, B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 14, p. 1733-1742, Nov. 2000.

SPRINGMAN, A. C. et al. Selection, recombination and virulence genes among group B streptococcal genotype. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 17, p. 5419-5427, Sept. 2009.

SUANYUK, N. et al. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand – Relationship to human isolates? **Aquaculture**, London, v. 284, n. 1/4, p. 35-40, Nov. 2008.

SUKHNANAND, S. et al. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1177-1186, Mar. 2005.

TENENBAUM, T. et al. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 6, p. 714-720, May 2007.

TETTELIN, H. et al. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 19, p. 12391-12396, Sept. 2002.

TETTELIN, H. et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 9, p. 13950-13955, Sept. 2005.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 10, p. 479-487, Oct. 2003.

YILDIRIM, A. Ö.; FINK, K.; LÄMMLER, C. H. Distribution of the hyaluronate lyase encoding gene *hylB* and the insertion element *IS1548* in streptococci of serological group B isolated from animals and humans. **Research in Veterinary Science**, London, v. 73, n. 2, p. 131-135, Oct. 2002.

ZAMRI-SAAD, M.; AMAL, M. N. A.; SITI-ZAHRAH, A. Pathological changes in red tilapia (*Oreochromis* spp) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, Edimburg, v. 143, n. 2/3, p. 227-229, Aug./Oct. 2010.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**ARTIGO 1****CLONALITY, VIRULENCE GENES AND PATHOGENICITY OF
Streptococcus agalactiae STRAINS ISOLATED FROM FISH**

Submetido ao periódico “Applied and Environmental Microbiology” (versão preliminar).

Daniela T. Godoy¹, Glei A. Carvalho-Castro¹, Ulisses P. Pereira¹, Carlos A. G. Leal¹, Rômulo C. Leite¹, Henrique C. P. Figueiredo^{1*}.

¹AQUAVET – Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

*Corresponding Author. Mailing Address: AQUAVET- Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil. 30123-970. Tel: +55 31 34092126, Fax: +55 31 34092080. E-mail: henrique@dmv.ufla.br

Running title: Virulence and clonal relationship of fish *S. agalactiae*.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae is one of the most important pathogens affecting human newborns and cultivated fish. It is the principal health problem for tilapia farming and is responsible for high economic losses worldwide. The diversity of *S. agalactiae* isolates and their main virulence traits in fish infections remain poorly understood. Thus, the goals of this study were to assess the genetic patterns of fish isolates of *S. agalactiae* and to evaluate the relationship between virulence gene profiles and *in vivo* pathogenicity. Forty-six isolates from Nile tilapia and Amazon catfish were screened for the following virulence genes: *bac*, *bca*, *bibA*, *cfb*, *cylE*, *hylB*, *gbs2018-6*, *iagA*, *lmb*, *scpB*, *fbsA*, and *fbsB*. The molecular capsular type and sequence type (ST) were determined. The isolates were all positive for *iagA*, *cfb*, *gbs2018-6*, *fbsA*, and *fbsB* and negative for *bac*, *bibA*, *bca*, and *scpB*. Variable results were found for *lmb*, *hylB*, and *cylE*. Two capsular types (Ia and Ib), four STs (103, 260, 552 and 553), and six virulence gene profiles (I to VI) were identified. ST-552 and ST-553 represent new allelic combination. This is the first time ST-103 was associated with fish disease. A new clonal complex, named CC 552, was first described here. Our results show that (i) fish strains of *S. agalactiae* are a genetically diverse population; (ii) they are highly virulent and exhibit an association between the virulence gene profiles and pathogenicity; and (iii) there is no association between virulence, ST, and capsular serotype for fish strains of *S. agalactiae*.

INTRODUCTION

Streptococcus agalactiae, also referred as Group B *Streptococcus* (GBS), is a Gram-positive pathogen with a broad host range. GBS is the most common cause of life-threatening bacterial infection in human newborns (2, 24, 34) and an important etiological agent of clinical and sub-clinical bovine mastitis (8, 18, 38, 44). In fish, *S. agalactiae* infections cause septicemia and meningoencephalitis, mainly in warm water species from freshwater, marine, or estuarine environments (9, 10, 11, 14, 27, 32, 35, 39, 52). Currently, *S. agalactiae* is an emerging pathogen associated with severe economic losses due to high mortality rates in fish farms (9, 27).

The genetic diversity, ancestry, evolution markers, and host specificity of *S. agalactiae* isolates have been evaluated in previous studies (12, 31, 44). The capsular serotype and multilocus sequence typing (MLST) are valuable tools for investigating genetic, epidemiological, and virulence relationships in this bacterium. Previous studies reported an association between genogroups and virulence in human isolates of *S. agalactiae* (6, 28). In addition, the GBS pathogenicity in mammals is determined by several virulence factors, mainly those associated with adhesion, invasion, tissue damage, and immune evasion (24, 34). However, for fish isolates of *S. agalactiae*, little is known about genetic and virulence determinants, relationships among isolates, and epidemiology of disease.

In this present study, we used the capsular serotype and MLST to address the molecular epidemiology of *S. agalactiae* from diseased fish and compare with human and bovine strains. Additionally, genetic virulence markers were detected and their association with pathogenicity in vivo in the natural host, Nile tilapia was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. A total of 46 strains of *Streptococcus agalactiae* from the AQUAVET bacterial culture collection isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and Amazon catfish (*Pseudoplatystoma fasciatum x Leiardinus marmoratus*) were evaluated (Table 1). The isolates were stored at -70°C until use. When ready to use, they were thawed and streaked onto 5% sheep blood agar plates and incubated at 28°C for 48 h.

DNA extraction and sequencing. Total DNA was extracted using the commercial DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. PCR products were purified using a Wizard PCR preps kit (Promega, Madison, WI). Sequencing reactions were performed using the Applied Biosystem BigDye terminator cycle sequence kit and run on ABI 3730XL genetic analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

Bacterial identification and molecular capsular serotyping. The isolates were characterized following Mian et al (2009). The identification was confirmed by *S. agalactiae*-specific PCR according to Mata et al (2004). All isolates were submitted to capsular polysaccharide typing by multiplex PCR assay, as described by Poyart et al (2007). Strains that were not serotypeable were submitted to serotype IX specific PCR (43). The strains NEM316 (type III) and 2603 (type V) were included as positive controls for multiplex PCR.

Multilocus sequence typing (MLST) and assignment to clonal groups. MLST was performed by sequencing the internal fragments from seven housekeeping genes (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* and *tkl*) according to Jones et al. (2003). Sequence types (ST) were defined by analyzing the seven concatenated sequences in the *S. agalactiae* MLST database

(<http://pubmlst.org/sagalactiae>). Mega 4 software (48) was used to construct an unrooted dendrogram showing the relationship among fish STs from this study and from human, bovine, and fish STs previously described (2, 3, 12, 45). The eBURST V3 program (<http://eburst.mlst.net>) (13) was used to identify clonal complexes among *S. agalactiae* strains isolated from human, bovines, and fish.

Detection of virulence genes. Screening was performed by PCR to detect the following virulence genes: *bac* (β C protein), *bca* (α C protein), *bibA* (bacterial immunogenic adhesin), *cfb* (CAMP factor), *cylE* (β -hemolysin/cytolysin), *hylB* (hyaluronate lyase), *gbs2018-6*, *iagA* (invasion-associated gene), *lmb* (laminin-binding protein), *scpB* (C5a peptidase), *fbsA* (fibrinogen-binding protein A), and *fbsB* (fibrinogen-binding protein B). The detection of *bac*, *bca*, *bibA*, *hylB*, *lmb* and *scpB* was performed as previously described (5, 41). Specific PCR reactions to detect *cylE*, *cfb*, *fbsA*, *fbsB*, *gbs2018-6*, and *iagA* were developed in this study. For those reactions, the primers were designed and PCR conditions were standardized (Tables 2 and 3). Nucleotide sequences of these genes from *S. agalactiae* strains 2603V/R (accession number: NC004116), A909 (NC007432), NEM316 (NC004368), 515 (NZAAJP00000000), H36B (NZAAJS000000000), and 18RS21 (NZAAJO00000000) were obtained from the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and aligned for the primer design. The construction and preliminary evaluation of the primers were performed using the softwares DNAMAM version 4.0 (Lynnon Corporation, Point-Claire, QC) and BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), respectively. To confirm the specificity of new primers, the PCR products of each one were sequenced and submitted to BLASTn analysis. All primers used were synthesized by Integrated DNA technologies (IDT, Coralville, IA) and are listed in Table 2. The strains NEM316 and 80427 (5) were used as positive controls of PCR reactions.

PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel, stained with 0.5x GelredTM (Biotium, Hayward, CA), and visualized by UV trans-illumination. A 100 bp ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA) was used as the molecular size standard. The genetic virulence profiles were determined based on presence or absence of the virulence genes screened.

Experimental infection. Experimental infections were performed to address the association between virulence genes profiles and different STs in the pathogenicity of *S. agalactiae* in Nile tilapia. Strains SA35-06 (ST-552, virulence profile I), SA52-07 (ST-260, I), SA74-08 (ST-260, IV), and SA95-10 (ST-260, VI) were selected for *in vivo* assays.

Nile tilapia fingerlings (mean weight 32.6 ± 15.1 g) were acquired from a commercial hatchery and were kept in a 57 L aquarium supplied with flow-through water. Ten fish comprised each experimental group. Fish were maintained on a 12:12 h light/dark period and water temperature of 26 °C and were fed to satiation twice a day with VITAFISH 31% (Matsuda, Álvares Machado, Brazil). Fish were acclimated for 10 days before the *in vivo* assays.

All *in vivo* assays were performed according to Mian et al. (2009). Briefly, the *S. agalactiae* strains were inoculated in brain heart infusion (BHI) broth and incubated at 28 °C under low agitation until the concentration reached 10^8 CFU/ml. Bacterial pellets were harvested and washed with PBS, pH 7.2. Fish were anesthetized by immersion in a bath containing 10 mg/L benzocaine. Fingerlings were inoculated with 0.1 ml of 10-fold dilutions of *S. agalactiae* suspensions ranging from 10^1 to 10^8 CFU/ml. A control group was inoculated with sterile PBS.

Challenged fish were monitored for 15 days and the mortality was recorded. Samples of brain and kidney were collected from all dead fish and from all fish that remained alive at the end of the experiment (euthanasiated with

an overdose of benzocaine) to re-isolate the bacteria. The LD50 value was determined following Reed and Muench (1938). For some strains used in the present study, LD50 were previously determined by Mian et al (2009). All *in vivo* experiments were conducted according to animal welfare standards and were approved by the Ethical Committee for Animal Experiments of the Federal University of Minas Gerais, Brazil.

RESULTS

Capsular serotype, STs, and clonal complexes of fish strains. Serotypes Ia (n = 2) and Ib (n = 42) were identified among 44 strains, and 2 strains were nonserotypeable (NT). Four STs were identified among the 46 strains analyzed, two of which were new (new allelic combinations) and are described for the first time in this paper: ST-552 and ST-553. The majority of strains belonged to ST-552 (n = 23) and ST-260 (n = 20). Two strains were ST-103 and only one strain was ST-553. Serotype Ia was exclusively found in association with ST-103. Serotype Ib and strains NT exhibited no association with a specific ST. The STs showed a relationship with geographic origin of the isolates: Strains from the Central-South Brazilian states (MT, MG, ES, SP, SC, and PR) belonged exclusively to ST-552 and ST-553, and those from Northeast Brazilian states (BA, AL, CE, and PE) belonged to ST-103 and ST-260 (Table 4). However, the eBurst analysis clustered ST-553, ST-552, and ST-260 into a new single clonal complex (CC), designated CC 552, and ST-103 as a singleton. The isolates from Nile tilapia were classified as ST-103, ST-260, ST-552, and ST-553, and strains from hybrid Amazon catfish were classified as ST-552. Figure 1 showed a dendrogram illustrating the phylogenetic relationship of main *S. agalactiae* STs from human, bovine, and fish isolates (2, 3, 12, 45) and the STs characterized in this study. Figure 2 showed the eBurst analysis results for these STs.

Detection of virulence genes. The PCR reactions developed in this study showed high effectiveness and specificity for detecting the virulence genes. BLASTn analysis of PCR products showed at least 99% similarity with reference genes deposited in the NCBI nucleotide database. All strains were negative for *bac*, *bca*, *bibA*, and *scpB* and positive for *fbsA*, *fbsB*, *gbs2018-6*, *cfb*, and *iagA*. Five strains (10.8%) were positive for *lmb*; 34 (73.9%) were positive for *cylE*; and 37 (80.4%) were positive for *hylB*. Six virulence gene profiles were determined based on the presence or absence of each gene and their combinations. Table 4 summarizes these results. There was no association between the virulence profiles and geographic origin of the isolates or the fish species from which they were isolated.

In vivo virulence of fish strains. All strains evaluated in this study were highly virulent to Nile tilapia, and our results suggest that there is no relationship between virulence and different STs (Fig. 3). However, the genetic virulence profile did show an association with the severity of the disease. Strain SA35-06 from profile I had a LD50 of $8.5 \times 10^{3.1}$ CFU, and that of SA52-07 from profile I had a LD50 of $3 \times 10^{3.7}$ CFU. The LD50 values of SA74-08 (profile IV) and SA95-10 (profile VI) both were < 10 CFU. Previous work determined a LD50 of $6.14 \times 10^{1.17}$ CFU for strain SA20-06 (profile VI) and a LD50 < 10 CFU for SA01-03, SA05-04, SA08-05, and SA16-06 from profile IV (27).

The first clinical signs of disease for strains from profile I (SA35-06 and SA52-07) appeared 72 hours post-infection (hpi) and included lethargy and anorexia. The characteristic clinical signs of streptococcosis, such as exophthalmia and erratic swimming, began 5 days post-infection (dpi). Fish infected with these strains died from 72 hpi until 14 dpi. Fish infected with strains SA74-08 (profile IV) and SA95-10 (profile VI) were the first to show clinical signs starting at 48 hpi. Experimental groups challenged with SA95-10

died from 48 hpi to 7 dpi. For SA74-08, the first mortalities were observed 24 hpi, with major occurrence until 7 dpi. *S. agalactiae* was recovered from brain and kidney tissue from all dead fish and also from surviving fish that showed clinical signs of disease. *S. agalactiae* was recovered from 50% of fish with no clinical signs of disease.

The LD50 values were calculated for *S. agalactiae* isolates with different genetic profiles. An association between presence of virulence factors and disease pattern in Nile tilapia was detected. Strains belonging to profiles IV and VI had a two log lower LD50 than strains belonging to profile I. In addition, faster development and higher disease intensity were observed in the fish challenged with strains belonging to profiles IV and VI compared to profile I. The difference between these profiles was the absence of *cylE* and *hylB* genes in profile I. These genes seem to be determinant of virulence intensity in Nile tilapia.

DISCUSSION

The diversity of Brazilian strains of *S. agalactiae* isolated from Nile tilapia and Amazon catfish was assessed by capsular typing and MLST analysis. Previous studies typed fish isolates from different countries as serotypes Ia, Ib, and III. *S. agalactiae* strains isolated from Kuwait and the USA all belonged to serotype Ia; isolates from Brazil and Israel were both Ia and Ib; and isolates from Thailand were Ia and III (3, 12, 46). In Brazil, Ib was the predominant serotype associated with outbreaks in fish farms. Two isolates were nonserotypeable by molecular assay. This phenomenon was previously described for human and bovine isolates, being more frequent in the bovine ones (19); it has been attributed to recombination of the capsular genes and transposition of mobile genetic elements (42, 25). The recent description of a novel capsular type from *S. agalactiae* isolated from human (43) argues for the potential of new discoveries, mainly for isolates from different hosts and environments.

The MLST results showed four different sequence types (ST-103, ST-260, ST-552, and ST-553) for the evaluated strains, two of which were described for the first time in this study (ST-552 and ST-553). An association between geographic origin and ST was observed. The isolates from the Northeast states of Brazil (AL, CE, and PE) were typed as ST-260, whereas those from the Central-South states (MT, MG, ES, SP, SC, and PR) were typed as ST-552, with only one exception (one ST-553 isolate). During expansion of tilapia farming in Brazil, different Nile tilapia lineages from distinct geographic origins were acquired and introduced in the country (23). Farmers in the Central-South states usually culture lineages that are commercially available worldwide, such as the GIFT lineage (15). In contrast, tilapia farmers in the northeast prefer to rear a specific lineage that initially was provided by the Brazilian National Department of Works Against the Droughts (DNOCS). The different tilapia lineage reared came from distinct countries and periods. The movement of animals for trade and recreation represents the main pathway of pathogen introduction and disease spread (16, 51). It is possible that different fish populations carried different *S. agalactiae* lineages, which could explain the geographic distribution of STs documented in this study.

No association between capsular type and MLST was detected for the vast majority of fish isolates evaluated. However, an association between capsular serotype and ST has been found for isolates from other hosts (3, 12). The fish lineages of *S. agalactiae* did not exhibit important diversification in terms of the capsule, in contrast to what has been found in human isolates (19, 21). MLST analysis revealed the occurrence of relatively homogeneous *S. agalactiae* genogroups in Brazil, being able to trace their macro distribution by country region. Evans et al. (2008) also found an association between ST of fish isolates and geographic areas.

Brazilian isolates of *S. agalactiae* from diseased fish were all positive for *iagA*, *gbs2018-6*, *fbsA*, and *fbsB*. The fish pathogenic isolates harbour a common core of putative virulence genes that may allow them to cause disease in this host. These genes are mainly related to adhesion and invasion, thus these processes are presumed to be fundamental steps for infection. However, the specialized virulence factor *lmb*, which is associated with adhesion and invasion, did not seem to influence the virulence of *S. agalactiae* in Nile tilapia. It was found just in a few strains, but its presence or absence did not alter the LD50 values or the disease progression. *Lmb* is an important factor in GBS adherence and invasion of the brain-blood barrier in infections in human newborns (1). Fish and human newborn illnesses have similar dynamics and targets, showing septicaemia followed by invasion and tissue damage in the central nervous system (CNS) (7, 10, 11, 24). Thus, the capacity to overcome anatomical and immunological barriers to reach the CNS is related to the virulence of human isolates. However, this seems not to be true for Nile tilapia. This fish species shows a specific and unexplained vulnerability to brain infection. Previous studies of *Streptococcus dysgalactiae* (30) and *Aeromonas hydrophila* (4) reported that these bacteria caused CNS diseases in Nile tilapia. These bacteria usually are not associated with brain infection in other fish species. These data suggest that Nile tilapia has a particular sensibility to CNS infections. This phenomenon can explain the lower importance of adherence and invasion factors in virulence intensity of *S. agalactiae* in Nile tilapia (i.e., mainly those associated with overcoming the blood-brain barrier).

This work establishes that fish isolates of *S. agalactiae* have background virulence genes comprising genes *gbs2018-6*, *iagA*, *fbsA*, and *fbsB*. The isolates that also were positive for *hylB* and *cylE* exhibited increased virulence in Nile tilapia as well as faster appearance of clinical signs. *HylB* is thought to be a spreading factor that contributes to the host tissue-invasive properties of

bacterial pathogenesis (34, 53). This virulence factor appears to play a minor role in the pathogenesis of *S. agalactiae* and may not be required for invasive disease in human newborns. In contrast, HylB is a crucial determinant of bovine mammary infections (47). HylB might act in different ways in GBS infections of humans and Nile tilapia. Higher hyaluronidase activity in fish isolates could explain this difference. This characteristic was previously observed in bovine strains compared to human ones (47). CylE is a pluripotent toxin that causes cytolytic effects in neurons and macrophages and induces apoptosis in immune cells (22, 29, 34, 37). Its effects in Nile tilapia tissues during *S. agalactiae* infections were not determined in this study. However, the faster neurological signs and disease intensity observed in tilapia challenged with *cylE*-positive strains suggest damage in the CNS. The neurotoxin activity of this virulence factor was described previously for human isolates (37). Our results suggest that for Nile tilapia, direct brain damage promoted by *S. agalactiae* could result in high virulence of isolates. Future work is needed to elucidate these findings.

S. agalactiae consist of a large and diverse core population with an unlimited pool of genes that lack correlation with capsular type, genotype, host tropism, and other properties (44). These traits result from frequent recombination resulting in the composite genome structures, being in accordance with pan-genome concept (50). The broad habitat range of *S. agalactiae* explains the great availability of the gene pool for lateral gene transfer. Occasionally, emerging recombinant clones will possess properties that allow them to successfully disseminate by clonal expansion and cause diseases in a particular host (44). This view seems to be true for fish isolates. The Brazilian strains originated from tilapia belonging to the same clonal complex (CC 552), which consists exclusively of fish isolates (Fig. 1). This CC also includes strains from the USA and Honduras (12). Figure 1 shows that fish strains belonging to ST-

261 (12) and ST-246 (3) constitute a CC with no predicted founder. These STs are closely related to CC 552, as indicated by the blue lines indicating the DLV (double-locus variation). The common background of virulence genes and the fact that all strains were positive for allele six of the *gbs2018* gene also support the suggestion of their clonal evolution. Six alleles have already been described for the *gbs2018* gene, showing a predictive specificity determined by host adaptation (20, 40, 45, 49) Allele six was first described from one trout *S. agalactiae* strain and was shown to be fish specific (3).

In addition, the “open pan genome” theory (50) presents plausible arguments to explain the singletons that could not be assigned to any CC. Some aspects of genetic diversity and virulence traits attributed to fish isolates corroborate with this view. Herein, ST-103 was reported for a fish isolate of *S. agalactiae* for the first time. This sequence type is a singleton that previously was described in bovine, cat, guinea pig and humans (2, 3, 45). Strains belonging in ST-103 seem to have a broad range of hosts and are not related to any CC. Evans et al. (2008) reported another ST (ST-7) that has a broad range of hosts: dolphins, fish, and humans. Strains from ST-7 and from ST-103 are both serotype Ia. These findings agree with the scenario raised by Evans et al. (2008) that *S. agalactiae* serotype Ia might have a zoonotic potential.

Although all isolates carried a common genetic background, several strains with different virulence gene profiles within the same ST were identified. This finding contradicts the close clonal and evolutionary relationships predicted for them. It is possible that for fish strains, important evolutionary events could not be tracked by MLST analysis. Moreover, a large genetic diversity in the base population might exist. Springman et al. (2009) reported that despite genetic diversity, bovine isolates shared common recombinant events in specific virulence genes. These data allowed them to make inferences about genetic relationships, host adaptation, and evolution of those strains. These analyses

could provide additional information and new insights about evolutionary relationships in fish isolates of *S. agalactiae*.

In conclusion, fish strains of *S. agalactiae* constitute a diverse population. The data presented herein demonstrate that five divergent populations can cause fish diseases (ST-103/ST-258/CC 7/CC 552/CC 261-246). Geographical distribution showed an association with STs. In contrast to human isolates, the virulence of fish strains of *S. agalactiae* cannot be predicted or inferred based on capsular type and ST data. According to the present results, the pathogenesis of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia seems to depend on common background virulence genes that are related to adherence and invasion, and pathogenesis can be intensified by tissue damage virulence factors such as *hylB* and *cylE* genes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Furnas Centrais Elétricas and CNPq. We would like to thank CAPES, FAPEMIG, and CNPq for students fellowships.

REFERENCES

1. **Al Safadi, R., S. Amor, G. Hery-Arnaud, B. Spellerberg, P. Lanotte, L. Mereghetti, F. Gannier, R. Quentin, and A. Rosenau.** 2010. Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring *IS1548* in *scpB-lmb* intergenic region. Plos one. **5**: e10794.
2. **Bohnsack, J. F., A. Whiting, M. Gottschalk, D. M. Dunn, R. Weiss, P. H. Azimi, J. B. Philips III, L. E. Weisman, G. G. Rhoads, and F. Y. C. Lin.** 2008. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. academic centers from 1995 to 1999. J. Clin. Microbiol. **46**:1285-1291.
3. **Brochet, M., E. Couvé, M. Zouine, T. Vallaëys, C. Rusniok, M. C. Lamy, C. Buchrieser, P. Trieu-Cuot, F. Kunst, C. Poyart, and P. Glaser.** 2006. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. Microbes Infect. **8**:1227-1243.
4. **Carvalho-Castro, G. A., C. O. Lopes, C. A. G. Leal, P. G. Cardoso, R. C. Leite, and H. C. P. Figueiredo.** 2010. Detection of type III secretion system in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. Vet. Microbiol. **144**:371-376.
5. **Corrêa, A. B. A., I. C. M. Oliveira, T. C. A. Pinto, M. C. Mattos, and L. C. Benchetrit.** 2009. Pulsed-field gel electrophoresis, virulence determinants and antimicrobial susceptibility profiles of type Ia group B streptococci isolated from humans in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **104**:599-603.
6. **Dele Davies, H., N. Jones, T. S. Whittam, S. Elsayed, N. Bisharat, and C. J. Baker.** 2004. Multilocus sequence typing of serotype III group B *Streptococcus* and correlation with pathogenic potential. J. Infect. Dis. **189**:1097-1102.

7. **Doran, K.S., and V. Nizet.** 2004. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: No longer in its infancy. *Mol. Microbiol.* **54**:23-31.
8. **Duarte, R. S., O. P. Miranda, B. C. Bellei, M. A. V. P. Brito, and L. M. Teixeira.** 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4214-4222.
9. **Duremdez, R., A. AL-Marzouk, J. A. Qasem, A. Al-Harbi, and H. Gharabally.** 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. *J. Fish Dis.* **27**:307-310.
10. **Eldar, A., Y. Bejerano, A. Livoff, A. Hurvitz, and H. Bercovier.** 1995. Experimental meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet. Microbiol.* **43**:33-40.
11. **Evans, J. J., P. H. Klesius, P. M. Gilbert, C. A. Shoemaker, M. A. Al Sarawi, J. Landsberg, R. Duremdez, A. Al Markouk, and S. Al Kenzi.** 2002. Characterization of β -hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *J. Fish Dis.* **25**:505-513.
12. **Evans, J. J., J. F. Bohnsack, P. H. Klesius, A. A. Whiting, J. C. Garcia, C. A. Shoemaker, and S. Takahashi.** 2008. Phylogenetic relationship among *Streptococcus agalactiae* from piscine, dolphin, bovine and human sources: A dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infection in Japan. *J. Med. Microbiol.* **57**:1369-1376.
13. **Feil, E. J., B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, and B.G. Spratt.** 2004. eBurst: Inferring patterns of evolutionary descent among cluster of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **186**:1518-1530.

14. **Figueiredo, H. C. P., D. O. Carneiro, F. C. Faria, and G. M. Costa.** 2006. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. **58**:678-680.
15. **Fülber, V. M., L. D. V. Mendez, G. L. Braccini, M. L. Barrero, M. Digmeyer, and R. P. Ribeiro.** 2009. Desempenho comparativo de três linhagens de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em diferentes densidades de estocagem. Acta Sci. Animal Sciences. **31**:177-182.
16. **Gozlan, R. E., E. J. Peeler, M. Longshaw, S. St-Hilaire, and S. W. Feist.** 2006. Effect of microbial pathogens on the diversity of aquatic populations, notably in Europe. Microbes Infect. **8**:1358-1364.
17. **Jones, N., J. F. Bohnsack, S. Takahashi, K. A. Oliver, M. S. Chan, F. Kunst, P. Glaser, C. Rusniok, D. W. M. Crook, R. M. Harding, N. Bisharat, and B. G. Spratt.** 2003. Multilocus Sequence Typing System for Group B *Streptococcus*. J. Clin. Microbiol. **41**:2530–2536.
18. **Keefe, G. P.** 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. Can. Vet. J. **38**:429-437.
19. **Kong, F., L. M. Lambertsen, H-C. Slotved, D. Ko, H. Wang, and G. L. Gilbert.** 2008. Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. J. Clin. Microbiol. **46**:2745-2750.
20. **Lamy, M. C., S. Dramsi, A. Billoët, H. Réglie-Poupet, A. Tazi, J. Raymond, F. Guérin, E. Couvé, F. Kunst, P. Glaser, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart.** 2006. Rapid detection of the “highly virulent” group B *Streptococcus* ST-17 clone. Microbes Infect. **8**:1714-1722.
21. **Lindahl, G., M. Stålhammar-Carlemalm, and T. Areschoug.** 2005. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin. Microbiol. Rev. **18**:102-127.

22. **Liu, G. Y., K. S. Doran, T. Lawrence, N. Turkson, M. Puliti, L. Tissi, and V. Nizet.** 2004. Sword and shield: linked group B streptococcal β -hemolysin/ cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defence. *P. Acad. Nat. Sci.* **101**:14491-14496.
23. **Lovshin, L. L.** 2000. Tilapia culture in Brazil. 133-140. In B.A. Costa-Pierce and J.E. Rakocy (eds). *Tilapia aquaculture in the Americas*. Vol 2. The aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
24. **Maisey, H.C., K. S. Doran, and V. Nizet.** 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**:e27.
25. **Martins, E. R., M. A. Pessanha, M. Ramirez, J. Melo-Cristino, and the Portuguese group for the study of Streptococcal infections.** 2007. Analysis of group B Streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3224-3229.
26. **Mata, A. I., A. Gibello, A. Casamayor, M. M. Blanco, L. Domínguez and J. F. Fernández-Garayzábal.** 2004. Multiplex PCR assays for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl. Environ. Microb.* **70**:3183-3187.
27. **Mian, G. F., D. T. Godoy, C. A. G. Leal, T. Y. Yuhara, G. M. Costa, and H. C. P. Figueiredo.** 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* **136**:180-183.
28. **Nakib, M., M. Longo, A. Tazi, A. Billoet, J. Raymond, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart.** 2011. Comparison of the Diversilab® system with multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus agalactiae* invasive strains. *J. Microbiol. Methods.* **85**:137-142.

29. **Nizet, V.** 2002. Streptococcal β -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends in Microbiol.* **10**:575-580.
30. **Nobrega-Netto, L., C. A. G. Leal, and H. C. P. Figueiredo.** 2011. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish. Dis.* **34**:251-254.
31. **Pereira, U. P., G. F. Mian, I. C. M. Oliveira, L. C. Benchetrit, G. M. Costa, and H. C. P. Figueiredo.** 2010. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolates from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* **140**:186-192.
32. **Plumb, J. A., J. H. Schachte, J. L. Gaines, and W. Peltier.** 1974. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and Northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Trans. Am. Fish Soc.* **103**:358-361.
33. **Poyart, C., A. Tazi, H. Réglie-Poupet, A. Billoët, N. Tavares, J. Raymond, and P. Trieu-Cuot.** 2007. Multiplex PCR assays from rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1985-1988.
34. **Rajagopal, L.** 2009. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol.* **4**:201-221.
35. **Rasheed, V., and J. Plumb.** 1984. Pathogenicity of a non-hemolytic group B *Streptococcus* sp. in Gulf killifish, *Fundulus grandis* Baird & Girard. *Aquaculture.* **37**:97-105.
36. **Reed, L. J., and H. Muench.** 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493-497.
37. **Reiss, A., J. S. Braun, K. Jäger, D. Freyer, G. Laube, C. Bühner, U. Felderhoff-Müser, C. Stadelmann, V. Nizet, and J. R. Weber.** 2011. Bacterial pore-forming cytolysin induces neuronal damage in rat model of neonatal meningitis. *J. Infect. Dis.* **203**:393-400.

38. **Richards, V. P., P. Lang, P. D. P. Bitar, T. L  febure, Y. H. Schukken, R. N. Zadoks, and M. J. Stanhope.** 2011. Comparative genomics and the role of lateral transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Genet. Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2011.04.019.
39. **Robinson, J. A., and F. P. Meyer.** 1966. Streptococcal fish pathogen. *J. Bacteriol.* **92**:512.
40. **Santi, I., M. Scarselli, M. Mariani, A. Pezzicoli, V. Massignani, A. Taddei, G. Grandi, J. L. Telford, and M. Soriani.** 2007. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Mol. Microbiol.* **63**:754-767.
41. **Santi, I., D. Maione, C. L. Galeotti, G. Grandi, J. L. Telford, and M. Soriani.** 2009. BibA induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B *Streptococcus*. *J. Infect. Dis.* **200**:564-570.
42. **Sellin, M., C. Olofsson, S. Hakansson, and M. Norgren.** 2000. Genotyping of the capsule cluster (*cps*) in nontypeable group B streptococci reveals two major *cps* allelic variants of serotype III and VII. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3420-3428.
43. **Slotved, H. C., F. Kong, L. Lambertsen, S. Sauer, and G. L. Gilbert.** 2007. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2929-2936.
44. **Sorensen, U. B. S., K. Poulsen, C. Ghezzi, I. Margarit, and M. Kilian.** 2010. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. *mBio.* **1**:e00178-10.
45. **Springman, A. C., D. W. Lacher, G. Wu, N. Milton, T. S. Whittam, H. Dele Davies, and S. D. Manning.** 2009. Selection, recombination and virulence genes among group B streptococcal genotype. *J. Bacteriol.* **191**:5419-5427.

46. **Suanyuk, N., F. Kong, D. Ko, G. L. Gilbert, and K. Supamattaya.** 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand – Relationship to human isolates? *Aquaculture*. **284**:35-40.
47. **Sukhnanand, S., B. Dogan, M. O. Ayodele, R. N. Zadoks, M. P. J. Cravers, N. B. Dumas, Y. H. Schukken, K. J. Boor, and M. Wiedmann.** 2005. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1177-1186.
48. **Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar.** 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. **24**:1596-1599.
49. **Tazi, A., O. Disson, S. Bellais, A. Bouaboud, N. Dmytruk, S. Dramsi, M. Y. Mistou, H. Khun, C. Mechler, I. Tardieux, P. Trieu-Cuot, M. Lecuit, and C. Poyart.** 2010. The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J. Exp. Med.* **207**:2313-2322.
50. **Tettelin, H., V. Maignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, J. Crabtree, A. L. Jones, A. S. Durkin, R. T. Deboy, T. M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. M. Ros, J. D. Peterson, C. R. Hauser, J. P. Sundaram, W. C. Nelson, R. Madupu, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, S. C. Daugherty, D. H. Haft, J. Selengut, M. L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimitrov, K. Watkins, K. J. B. O'Connor, S. Smith, T. R. Utterback, O. White, C. E. Rubens, G. Grandi, L. C. Madoffi, D. L. Kasper, J. L. Telford, M. R. Wessels, R. Rappuoli, and C. M. Fraser.** 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome”. *P. Acad. Nat Sci.* **102**:13950-13955.

51. **Whittington, R.J., and R. Chong.** 2007. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies. *Prev. Vet. Med.* **81**:92-116.
52. Yanong, R. P. E., and R. F. Floyd. 2002. Streptococcal infections of fish. Circular FAO57, Florida Cooperative Extension Service, IFAS, University of Florida.
53. **Yildirim, A. Ö., K. Fink, and C. H. Lämmli.** 2002. Distribution of the hyaluronate lyase encoding gene *hylB* and the insertion element *IS1548* in streptococci of serological group B isolates from animals and humans. *Res. Vet. Sci.* **73**:131-135.

FIGURE

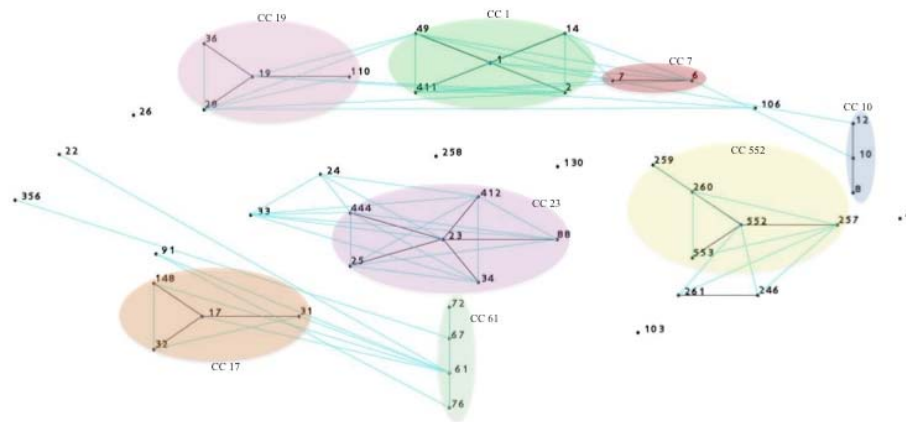


Figure 1 Clonal complexes and singletons of human, bovine and fish isolate of *S. agalactiae* STs using the eBurst software program. The blue lines show double-locus variants. The coloured circles show the different CCs. Human isolates are represented in CC 1, CC 7, CC 10, CC 17, CC 19 and CC 23 and by ST-4, ST-22, ST-26, ST-106 and ST-130. Bovine isolates are represented in CC 61 and by ST- 91 and ST-356. Fish isolates are represented in CC 552 and by ST-7, ST-246, ST-258 and ST-261. ST-103 comprises isolates from human, bovine and fish

TABLES

Table 1 Geographic origin, year of isolation and fish species from *S. agalactiae* strains used in this study

Year of isolation	Brazilian state	Farm	Fish species	n	
2003	Minas Gerais (MG)	A	<i>Oreochromis niloticus</i>	2	
2004	Espirito Santo (ES)	B	<i>Oreochromis niloticus</i>	2	
2005	Bahia (BA)	C	<i>Oreochromis niloticus</i>	2	
		Espírito Santo	D	<i>Oreochromis niloticus</i>	2
2006	São Paulo (SP)	E	<i>Oreochromis niloticus</i>	4	
		F	<i>Oreochromis niloticus</i>	4	
		Paraná (PR)	G	<i>Oreochromis niloticus</i>	1
		H	<i>Oreochromis niloticus</i>	2	
2007	Ceará (CE)	I	<i>Oreochromis niloticus</i>	3	
2008	Ceará	J	<i>Oreochromis niloticus</i>	2	
		K	<i>Oreochromis niloticus</i>	2	
2009	Santa Catarina (SC)	L	<i>Oreochromis niloticus</i>	2	
	Mato Grosso (MT)	M	<i>Pseudoplatystoma fasciatum X Rhamdia sebae</i>	5	
2010	Alagoas (AL)	N	<i>Oreochromis niloticus</i>	5	
	Pernambuco (PE)	O	<i>Oreochromis niloticus</i>	4	
		P	<i>Oreochromis niloticus</i>	4	

Table 2 Oligonucleotide primers of virulence genes evaluated in this study

Primers	Sequences 5'-3'	Reference
scpB-F	5' CCTGCTAAAACCTGCTGATAC 3'	Corrêa et al., 2009
scpB-R	5' CATAAGCATAGTCGTAAGCC 3'	Corrêa et al., 2009
lmb-F	5' CCGTCTGTAAATGATGTGGC 3'	Corrêa et al., 2009
lmb-R	5' GAAATACCCGAGATACCAAG 3'	Corrêa et al., 2009
hylB-F	5' CACCAATCCCCACTCTACTA 3'	Corrêa et al., 2009
hylB-R	5' TGTGTCAAACCATCTATCAG 3'	Corrêa et al., 2009
bca-F	5' CTACAATCCAGGGAGTGCA 3'	Corrêa et al., 2009
bca-R	5' ACTTTCTCCGTCCTTAG 3'	Corrêa et al., 2009
bac-F	5' AAGCAACTAGAAGAGGAAGC 3'	Corrêa et al., 2009
bac-R	5' TTCTGCTCTGGTGTTTTAGG 3'	Corrêa et al., 2009
cylE-F	5' CATTGCGTAGTCACCTCCC 3'	Present study
cylE-R	5' GGGTTTCCACAGTTGCTTGA 3'	Present study
fbsB-F	5' GCGCAAACCTTCTGTCCAA 3'	Present study
fbsB-R	5' CCGATACGATTGTCCAAATG 3'	Present study
fbsA-F	5' GAACCTTCTTGTCACACTTG 3'	Present study
fbsA-R	5' TTGATCCTAGCACTCCCA 3'	Present study
cfb-F	5' AAGCGTGTATTCCAGATTCC 3'	Present study
cfb-R	5' AGACTTCATTGCGTGCCAAC 3'	Present study
iagA -F	5' CGGGATTGATCTAAGTCGCT 3'	Present study
iagA-R	5' CCATCAACATCAGTCGCTAA 3'	Present study
gbs2018-6_F	5' CAGTGTCTGCTGAGAGTTC 3'	Present study
gbs2018-6_R	5' GCTTCACCCGTTGATGGTA 3'	Present study
bibA-F	5' AATCGAAAACAACGTTGGAAG 3'	Santi et al., 2009
bibA-R	5' AAACCAGGCTTCATCAGTCATT 3'	Santi et al., 2009

Table 3 PCR conditions for the detection of virulence genes *cylE*, *cfb*, *fbsA*, *fbsB*, *iagA* and *gbs2018-6*

Target gene	MgCl ₂ (mM)	dNTP (fM)	Primer (fM)	Taq (U)*	Time and temperature conditions	Amplicon size (bp)
<i>cylE</i>	1	0.16	0.1	1.25	35x (95°C 30 sec, 58°C 40 sec, 72°C 30 sec)	380
<i>iagA</i>	1	0.1	0.1	0.75	30x (95°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec)	459
<i>fbsA</i>	1.25	0.1	0.1	0.75	35x (95°C 30 sec, 58,3°C 30 sec, 72°C 30 sec)	556
<i>fbsB</i>	1	0.1	0.1	0.5	35x (95°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 25 sec)	417
<i>gbs2018-6</i>	1.5	0.2	0.2	1	35x (95°C 30 sec, 60°C 60 sec, 72°C 90 sec)	1018
<i>cfb</i>	1	0.2	0.1	0.5	35x (95°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec)	317

* GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega)

Table 4 Capsular serotype, sequence type (ST), virulence profiles and LD50 for 46 fish strains of *S. agalactiae* tested

Serotype	MLST	virulence profile	gbs											n	LD50 (n)	Geographic origin ^{=II}	
			<i>iagA</i>	<i>2018-6</i>	<i>fbsA</i>	<i>fbsB</i>	<i>cfb</i>	<i>hyl</i>	<i>cylE</i>	<i>lmb</i>	<i>scpB</i>	<i>bibA</i>	<i>bac</i>				<i>bca</i>
1a	103	IV	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	2	< 10 CFU (1)*	BA
1b	553	VI	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1	6.14x10 ^{1.17} CFU (1)*	PR
	552	II	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	8		SP/ PR/ MG
		IV	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	14	< 10 CFU (1)+	MG/ ES/ SP/ PR/ SC/ MT
	260	I	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	1	3x10 ^{3.7} CFU (1)+	CE
		II	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1		CE
		III	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	4		PE
		IV	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	10	< 10 CFU (3)*	CE/PE/AL
V		+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	1		PE/AL	
VI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	2	< 10 CFU (1)+	AL		
NS	552	I	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1	8.5x10 ^{3.1} CFU (1)+	SP	
	260	V	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	1		PE	

* Previous work, +present work

^{II}Bahia (BA), Paraná (PR), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), Santa Catarina (SC), Mato Grosso (MT), Ceará (CE), Pernambuco (PE), Alagoas (AL)

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O *Streptococcus agalactiae* é o principal patógeno de peixes tropicais cultivados por todo o mundo, inclusive no Brasil. A combinação de análises de diversidade genética e virulência permitiu uma melhor compreensão da epidemiologia do *S. agalactiae* nos peixes.

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que cinco populações distintas de *S. agalactiae* causam doenças nos peixes (ST-103, ST-258, CC 7, CC 552 e CC 261-246). Os ST-258, CC 552 e CC 261-246 são formados exclusivamente por *S. agalactiae* de peixes. O CC 7 é formado por *S. agalactiae* isolados de peixes e seres humanos. O ST-103 é multi-hospedeiro e possui *S. agalactiae* isolados de seres humanos, de bovinos e de peixes. A diversidade do *S. agalactiae* é o resultado da transferência horizontal de genes. Ocasionalmente, novos clones surgem, propiciando sua adaptação a uma vasta gama de hospedeiros.

No Brasil, os *S. agalactiae* isolados de peixes pertencem a cinco STs (ST-103, ST-257, ST-260, ST-552 e ST-553), sendo o ST-552 e o ST-553 descritos pela primeira vez, e o ST-103 descrito pela primeira vez em *S. agalactiae* isolados de peixes. Existe uma associação entre os STs e as macrorregiões do país, como pode ser observado na Figura 2.

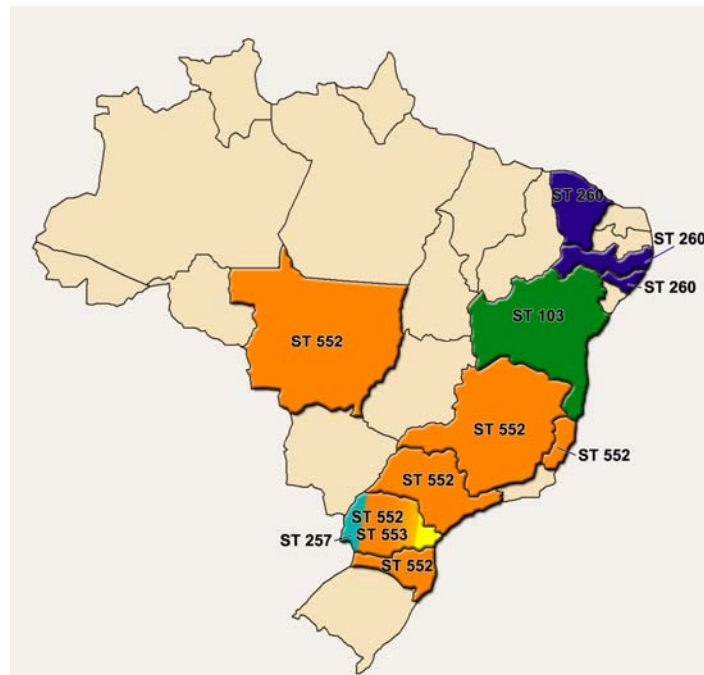


Figura 2 Distribuição dos STs dos *S. agalactiae* isolados nos diferentes estados Brasileiros. No Nordeste, temos as ST-103 e ST-260. Na região Centro-Sul, temos as ST-552, ST-553 e ST-257

Os *S. agalactiae* isolados no Brasil são altamente virulentos para a tilápia do Nilo, o que pôde ser observado a partir dos baixos valores de DL50 obtidos nos ensaios de infecção experimental. Este trabalho estabelece que os *S. agalactiae* isolados de peixes possuem um núcleo básico (“background”) de genes de virulência envolvidos na aderência ao e na invasão do hospedeiro formado pelos genes *gbs2018-6*, *fbsA*, *fbsB* e *iagA*. Isolados positivos para o genes de background e adicionalmente positivos para *hylB* e *cylE* apresentaram um aumento na virulência para a tilápia do Nilo. Não houve associação entre ST e virulência do *S. agalactiae*. Isso mostra que o perfil de virulência dos isolados é de grande importância para predizer a patogenicidade *in vivo*.