



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización morfológica de la adherencia e invasión de *Streptococcus agalactiae* a la mucosa intestinal de la tilapia *Oreochromis* sp., modelo *in vitro*

Gersson Manuel Vásquez Machado

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Bogotá, Colombia
2019

Caracterización morfológica de la adherencia e invasión de *Streptococcus agalactiae* a la mucosa intestinal de la tilapia *Oreochromis* sp., modelo *in vitro*

Gersson Manuel Vásquez Machado

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Salud Animal

Director:

DVM, Esp, DMV Carlos A Iregui C

Línea de Investigación:

Fisiopatología

Grupo de Investigación:

Grupo de Patobiología Veterinaria

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Bogotá, Colombia

2019

A DIOS, quien es la fuente de inspiración y sabiduría, la fuerza que mueve todo el universo, mi guía, amigo fiel que nunca falla. A mi linda esposa, por su amor constante, paciencia, nobleza y ayuda idónea; a mis hijas, a mis padres y a mis hermanos por su amor, apoyo y fe en mi proyecto de vida. A mis profesores y compañeros patólogos quienes más que colegas han sido amigos incondicionales, siempre preocupados por mi bienestar.

Agradecimientos

Al Doctor Carlos Iregui mi inmensa gratitud, más que un profesor un maestro, estimulador del pensamiento y la creatividad, quien nos enseñó una manera diferente de hacer país. Por su disposición permanente e incondicional en la dirección y asesoramiento científico de éste trabajo y por el estímulo constante para continuar creciendo intelectualmente, mis más sinceros agradecimientos y mi más profunda admiración.

Al doctor Benjamín Doncel, ejemplo de tesón, esfuerzo y disciplina, maestro incansable, quien más que un profesor ha sido un amigo que con sus consejos y ejemplo contribuyó a la distinción laureada de esta investigación.

A la doctora Lucia por el cariño y aprecio brindado.

A mis compañeros del grupo de investigación Paola, Alba, Andrés, Giovanny y Marilly, por su paciencia, instrucción y aportes tanto a mi crecimiento personal como intelectual

A mis amigos y compañeros del laboratorio Jersson, Jahnier y Juan, por los días de estudio, dedicación y esos momentos de confraternidad que nunca se olvida y que enriquecieron mi estadía en la universidad.

Finalmente, a mis hermanos de la iglesia de Peniel, la iglesia de mi corazón por sus oraciones incansables, apoyo y amor incondicional.

Resumen

Estreptococosis en tilapia (*Oreochromis* sp.) en Colombia es causada por *Streptococcus agalactiae* y probablemente es la enfermedad más importante para la producción de esta especie íctica en todo el mundo. La prevención de la infección y la enfermedad por este patógeno es necesaria y debe ser abordada no sólo por razones económicas, sociales, de comercio internacional, sino también de salud pública. La presente investigación estandarizó un cultivo de intestino de tilapia *in vitro* el cual se mantuvo viable hasta 2 horas y nos permitió detallar la respuesta integrada de la mucosa intestinal una vez el patógeno hace contacto con el epitelio. En este estudio se demostró que el *S. agalactiae* se despoja de la cápsula para adherirse al epitelio; se adhiere en grupos, cadenas o bacterias solitarias que se pueden dividir sobre el borde apical de los enterocitos; Se adhiere e invade casi exclusivamente por la porción apical de los pliegues; atraviesa la mucosa utilizando la ruta transcelular. Una vez en el citoplasma de los enterocitos las bacterias continúan dividiéndose. Atraviesan el epitelio hasta llegar a la lámina propia y acceden a la circulación. Durante todo el proceso de adherencia e invasión no se evidenció una respuesta inflamatoria de linfocitos ni respuesta de las células caliciformes en el epitelio.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*, tilapia, cultivo *in vitro*, caracterización morfológica, adhesión, invasión.

Abstract

Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis* sp.) in Colombia is caused by *Streptococcus agalactiae*, probably the most important disease for the fish production worldwide. Prevention of the infection and illness by this pathogen is required and must be addressed not only for economic, social reasons, international trade, but also for public health. This research standardized *in vitro* culture of tilapia intestine which remained viable up to 2 hours and allowed us to detail the integrated intestinal mucosal response once pathogen contacts the epithelium. In this study we showed that the *Streptococcus agalactiae* sheds itself of the capsule to adhere to the epithelium; It adheres in groups, chains or lonely bacteria that can be divided on the apical border of enterocytes; It adheres and invades almost exclusively by the apical portion of the folds; through the mucosa using the transcellular route. Once in the cytoplasm of enterocytes the bacteria continue to divide. They cross the epithelium to reach the propria and reach the circulation. Throughout the process of adherence and invasion an inflammatory lymphocyte response or goblet cells response in the epithelium was not evidenced.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, tilapia, *in vitro* culture, morphological characterization, adhesion, invasion.

Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract.....	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVI
Introducción	1
Capítulo 1. Patobiología de la estreptococosis en peces.....	3
1.1 Estreptococosis en peces.....	3
1.1.1 Agente etiológico	3
1.1.2 Situación epidemiológica nacional e internacional de la estreptococosis	6
1.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	8
1.2.1 Formas de presentación y manifestaciones patológicas en peces.....	11
1.2.2 Características de la bacteria.....	12
1.2.3 Diagnóstico.....	17
1.2.4 Mecanismos de virulencia	17
1.2.5 Mecanismos de adherencia de <i>S. agalactiae</i>	17
1.2.6 Regulación de la adherencia.....	19
1.2.7 Mecanismos de invasión del <i>S. agalactiae</i>	20
1.3 Modelos de estudio de la estreptococosis	21
Capítulo 2. Caracterización morfológica de la adherencia e invasión de <i>S. agalactiae</i> a la mucosa intestinal de la tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.).....	37
2.1. Introducción.....	37
2.2 Materiales y métodos	39
2.2.1 Cultivo <i>In vitro</i> de intestino de Tilapia (<i>Oreochromis</i> sp).....	39
2.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> (SaTiBe08-18)	40
2.2.3 Procesamiento de los tejidos por hematoxilina y eosina, inmunoperoxidasa, microscopia electrónica de transmisión Y PAS-Alcian blue	40
2.2.4 Evaluación histopatológica	41
2.2.5 Estadística	44
2.2.5.1 Análisis estadístico:	44
2.3 Resultados.....	44
2.3.1 Estandarización del cultivo <i>ex vivo</i> de intestino	44
2.3.2 Caracterización morfológica de la adherencia e invasión de <i>S. agalactiae</i> a la mucosa intestinal de tilapia	47
2.3.3 Alteraciones de la mucosa en explantes infectados con <i>S.a</i>	58

2.3.4 Coloración de Alcian blue y Pas.....	64
2.4 Discusión	65
2.5 Conclusiones y Recomendaciones	71
2.5.1 Conclusiones	71
2.5.2 Recomendaciones	72
2.6 Referencias	72
A. Anexo: Hipótesis planteadas en el modelo estadístico.....	77

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Distribución de los principales estreptococos de importancia clínica de acuerdo a sus características patogénicas y clínicas.....	13
Figura 2-1: Anillos intestinales cultivado <i>ex vivo</i> , sin bacteria e inoculados con <i>Streptococcus agalactiae</i>	42
Figura 2-2: Fragmentos de intestino de tilapia mantenidos en medio mínimo esencial DMEM.....	45
Figura 2-3: Intestinos de tilapia mantenidos en incubación durante 120 y 240 minutos.....	46
Figura 2-4: Adherencia de <i>S. agalactiae</i> SaTiBe08-18 (WT) al epitelio intestinal de la tilapia, después de lavar la bacteria en SSF pH 5. H & E, 40X.....	48
Figura 2-5: Comparación de adherencia entre tres tiempos de incubación (20, 30 y 40min) y tres dosis de concentración bacteriana (10^7 , 10^8 y 10^9 UFCml ⁻¹). El asterisco se refiere a adherencia significativa al epitelio intestinal respecto al control negativo (0UFCml ⁻¹) durante el mismo tiempo de incubación *=P<0.05.....	49
Figura 2-6: Sistema de puntuación utilizado para calificar el grado de adhesión de <i>S. agalactiae</i> (SaTiBe08-18 WT) al epitelio intestinal.....	50
Figura 2-7: Intestino de tilapia mantenido durante 40 minutos de incubación e inoculado con 10^9 UFC de <i>S.a.</i> H&E e IPI.....	51
Figura 2-8: Microscopia electrónica de transmisión (MET) de SaTiBe08-18 en medio de cultivo.....	54
Figura 2-9: MET de explantes de intestino de tilapia inoculados con <i>S. agalactiae</i> (SaTiBe08-18). Se aprecian diferentes cambios morfológicos en la bacteria en la medida que avanza desde el lumen hasta su adhesión al epitelio.....	55
Figura 2-10: MET de explantes de intestino de tilapia inoculados con <i>S. agalactiae</i> (SaTiBe08-18), mostrando estructuras fibrilares en forma de pelos.....	57
Figura 2-11: Estrechamiento de la porción apical de los pliegues donde se adhieren las bacterias.....	59
Figura 2-12: MET de un explante de intestino de tilapia inoculado con <i>S. agalactiae</i> (SaTiBe08-18) con pérdida extensa y severa de microvellosidades y un grupo de cocos posicionado sobre una microvellosidad.....	61

- Figura 2-13:** múltiples estreptococos en el citoplasma de dos enterocito. Corte semidelgado (A) y MET (B).....62
- Figura 2-14:** Microfotografía electrónica de transmisión (MET) en la cual se observan múltiples cocos que han atravesado el epitelio y han alcanzado la lámina propia (LP)..... 64
- Figura 2-15:** Intestino inoculado con *S. agalactiae* para evaluar la respuesta de las células caliciformes y caracterizar el tipo de mucinas secretadas. La coloración azul de las células caliciformes indica que las mucinas que se están produciendo son neutras. PAS/Alcian Blue..... 65

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Principales características de identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> aislado de peces.....	16
Tabla 2-1: División de los grupos experimentales de acuerdo a la concentración bacteriana y el tiempo de incubación.....	40
Tabla 2-2: Sistema de puntuación utilizado para la evaluación del modelo de infección de <i>S. agalactiae</i> en explantes de intestino de tilapia.....	43

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
β	Beta		

Abreviaturas

β -h/c	β -haemolysin/cytolysin
BHI	Brain Heart Infusion
BTA	Agar Triptona Sangre
CC	Clonal Complex
EOD	Early Onset Disease
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>
H&E	Hematoxilina y Eosina
IPI	Inmunoperoxidasa Indirecta
LOD	Late Onset Disease
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MLST	Multilocus Sequence Type
PAS	Periodic Schiff Acid
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
<i>S.a.</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
ST	Sequence Type
THA	Tod Hewid Agar
THB	Tod Hewid Broth
TSA	Trypticase Soy Agar
WT	Wild Type

Introducción

La acuicultura es uno de los sectores de más rápido crecimiento en la industria de producción de alimentos en el mundo, con un incremento anual del 8,9% (Bondad-Reantaso et al., 2005). En la década de 1950 la producción fue de aproximadamente un millón de toneladas y en el 2004 alcanzó 59,4 millones de toneladas. En Latinoamérica y la región Caribe, el desarrollo anual fue del 21,3% para el año 2006, esta proporción significó el 2,3% de la producción mundial (Subasinghe, 2006). La producción está principalmente sustentada por organismos dulceacuícolas (Elvira & Almodóvar, 2007), entre los que se destaca el cultivo de la tilapia como el principal en la acuicultura tropical por ser una fuente importante de proteína e ingresos económicos, principalmente en países en vía de desarrollo.

En Colombia la principal especie íctica para consumo humano es la tilapia que representa el 49% de la producción piscícola total (Zubieta et al., 2008). El rápido crecimiento en la acuicultura mundial, asociado a la globalización del comercio, introducción de nuevas especies y sistemas de manejo intensivo, han incrementado los problemas sanitarios y la aparición de enfermedades emergentes (Bondad-Reantaso et al., 2005). Entre las principales enfermedades bacterianas de los peces, la estreptococosis es considerada la principal patología de origen bacteriano presente en las tilapias. En Colombia las enfermedades causadas por *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* se reportan como las mayores amenazas para la producción de tilapia en nuestro país (Rey et al., 2003), pero el patógeno más importante desde el punto de vista sanitario, económico, social y de salud pública es el *Streptococcus agalactiae*. Algunas medidas para la prevención y control de la estreptococosis incluyen los tratamientos antibióticos y las vacunaciones con bacterinas. Los antibióticos han incrementado la sobrevivencia de las poblaciones de peces afectadas, pero a largo plazo, los *Streptococcus* desarrollan resistencia al medicamento utilizado. Por otro lado, las vacunas: bacterinas con o sin sus productos extracelulares, confieren protección contra cepas homólogas, sin embargo, en algunos casos han

favorecido el desarrollo de variantes de la misma bacteria (Verschuere et al., 2000). Por lo tanto, la estrategia más usada actualmente es el manejo de las condiciones ambientales que prevengan el desarrollo de la enfermedad, como la disminución de la densidad de siembra y el control de la temperatura del agua (Agnew & Barnes, 2007).

Se sabe que para ingresar al hospedero algunas bacterias deben adherirse e invadir a través de los epitelios de mucosas. En el caso del *Streptococcus agalactiae* tanto en peces como en mamíferos, son pocos los estudios de los mecanismos de adherencia e invasión a epitelios. En peces, la evidencia más cercana fue reportada por Iregui et al., (2016), quienes en un ensayo de inoculación intragástrica de *S. agalactiae* observaron la adhesión e invasión de la misma a través del epitelio gastrointestinal, proponiendo la vía oral como la principal ruta de ingreso del patógeno al hospedero. El conocimiento del mecanismo de adherencia e invasión de *S. agalactiae* en las tilapias permitirá formular estrategias de prevención y control ecológicamente viables. En la presente investigación se propuso caracterizar morfológicamente las primeras etapas de interacción hospedero patógeno (adherencia e invasión) de *S. agalactiae* a la mucosa intestinal de la tilapia mediante la utilización de microscopía de luz, Microscopía Electrónica de Transmisión, Inmunoperoxidasa Indirecta (IPI) y tinciones de H&E, azul de toluidina y PAS-Alcian blue, con el fin de establecer la principal ruta de translocación utilizada por la bacteria para atravesar el epitelio intestinal, repuesta de las células caliciformes del intestino a la infección con la bacteria, tipo de mucinas secretadas durante la infección (ácidas o neutras) y establecer un organocultivo *in vitro* de intestino de esta especie que permitiera evaluar dicha interacción.

Capítulo 1. Patobiología de la estreptococosis en peces

1.1 Estreptococosis en peces

1.1.1 Agente etiológico

El término estreptococosis en patología de peces agrupa una serie de procesos causados por diferentes *Streptococcus* que inducen cuadros clinicopatológicos similares (Toranzo et al., 1994; Akhlaghi et al., 1996; Múzquiz et al., 1999; Toranzo et al., 2005). Los *Streptococcus* son un género bacteriano de cocos Gram positivos, que en su mayoría inducen enfermedad generalmente caracterizada por lesiones purulentas tanto en las superficies corporales como en órganos internos y afectan un amplio rango de hospederos (Cunningham, 2000), incluyendo a los peces. En los últimos la enfermedad es sistémica y en los casos de manifestación clínica, comúnmente cursa con signos neurológicos. La estreptococosis se reporta en más de 20 especies piscícolas cultivadas en aguas dulces, estuarinas o saladas de muchas partes del mundo (Toranzo et al., 1994; Múzquiz et al., 1999; Kusuda & Salati, 1993).

Esta enfermedad es considerada actualmente uno de los problemas sanitarios más importantes en la acuicultura mundial debido a su amplia distribución geográfica, las diversas especies afectadas, las cuantiosas pérdidas por mortalidad, costos de tratamiento, disminución en el crecimiento y dificultad en la comercialización (Toranzo et al., 1994; Bercovier et al., 1997; Shoemaker & Klesius, 1997). También se ha aumentado la preocupación por la creciente aparición de casos clínicos en humanos (Weinstein et al., 1997).

Para el año 2000 se estimaron pérdidas anuales en la producción piscícola de alrededor de 150 millones de dólares y éstas aumentaron a más de 250 millones de dólares al año en el 2008 (Klesius et al, 2000; Klesius et al, 2008).

Los primeros reportes de estreptococosis en peces fueron hechos por Hoshina et al, (1958) en truchas arco iris cultivadas en Shizouka Japón. Después de eso, Robinson & Meyer (1966) informaron de dos epizootias, ambas en Golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) con *Streptococcus*. Mientras tanto, Plumb et al. (1974) aislaron *Streptococcus* sp. de más del 50% de los peces enfermos durante una epizootia en las bahías estuarinas a lo largo de la Florida, Alabama, y la costa del Golfo de México, en los Estados Unidos en 1972. Desde entonces numerosas especies de peces han sido encontradas susceptibles a la infección, incluyendo salmón, salmonete, limpiabotas dorado, pinfish, anguila, trucha de mar, tilapia, esturión y lubina rayada (Inglis et al., 1993). *Streptococcus* también se ha aislado de una variedad de peces ornamentales, incluyendo tiburón arco iris, tiburón negro de cola roja, rosey barbs, danios, algunos cíclidos incluidos *Venustus Nimbochromis* "Haplochromis" venustus, *Pelvicachromis* sp. Y varias especies de tetras (Russo et al., 2006). Existen diferentes especies de *Streptococcus* que causan enfermedad en peces, muchos de los cuales no se han caracterizado completamente. La mayoría de las especies que son patógenas para peces se encuentran de forma natural en el medio ambiente. Algunos ejemplos de especies de *Streptococcus* que se han asociado con enfermedad en peces incluyen *Streptococcus difficilis*, aislado de peces en Israel; *Streptococcus milleri*, aislado de muestras de riñón de koi observado con ulceraciones externas y *Streptococcus parauberis*, aislado de Turbot en una piscifactoría en el norte de España (Austin & Austin 1999). *Streptococcus iniae* aislado de peces y mamíferos enfermos (Austin & Austin, 1999). *Streptococcus agalactiae* también conocido como *streptococcus* del grupo B (GBS) es otra especie perteneciente a este género, la cual se ha asociado con enfermedad en un amplio rango de hospederos: mamíferos, reptiles, anfibios y peces (Elliott J et al., 1990). Se ha asociado a epizootias en peces silvestres y en cautiverio en EE.UU., Israel, Kuwait, Tailandia y Brasil (Plumb et al., 1974; Baya et al., 1990; Eldar et al., 1994; Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Salvador et al., 2005; Suanyuk et al., 2005). GBS también se ha reportado en mamíferos acuáticos como delfín nariz de botella *Tursiops truncatus*, tanto en cautiverio como silvestres, (Zappulli et al., 2005; Evans et al., 2006).

Las especies ícticas con altos volúmenes de producción son las más afectadas por estreptococosis, entre ellas las tilapias.

S. agalactiae y *S. iniae* son las principales especies bacterianas del género streptococcus que afectan la producción de tilapia en el mundo (Evans et al., 2006). Dentro del grupo de los cocos, *S. iniae* es considerado el más importante (Agnew & Barnes, 2007). Éste afecta distintas especies de peces en el mundo, y se reportan casos en humanos. Fue aislado por primera vez de abscesos subcutáneos en un delfín de agua dulce, *Inia geoffrensis* en 1976 en los Estados Unidos (Pier & Madin, 1976), desde entonces la bacteria ha sido reportada en muchas especies de peces estuarinos, marinos y de agua dulce de 15 países en 5 continentes, incluyendo África, Asia, Oceanía, Europa y América. Las especies de peces susceptibles incluyen ayu (Kitao et al., 1981), barramundi (Bromage et al., 1999), salmon coho (Eldar et al., 1995), seabass europeo (Zlotkin et al., 1998), mullet gris (Eldar et al., 1995), grouper (Kvitt & Colorni, 2004), trucha arcoíris (Eldar et al., 1994), red drum (Shen et al., 2005), snapper (Ferguson et al., 2000), silver bream (Bromage & Owen, 2002), tilapia (Klesius et al., 2006), and yellowtail (Kaige et al., 1984).

Por otro lado, *S. agalactiae*, identificado por primera vez a partir de muestras de riñón, ojo, hígado y fluidos corporales de un pez en Alabama (Wilkinson et al., 1973) y posteriormente diagnosticado como causa de meningoencefalitis en peces en 1994, (identificado inicialmente como *Streptococcus difficile*) (Eldar et al., 1994), es aislado cada vez con mayor frecuencia en brotes de mortalidad en el ámbito mundial y es considerado actualmente como el principal patógeno de peces cultivados en granjas, principalmente tilapia (Delannoy et al., 2013) y es reconocido como el principal agente etiológico relacionado con septicemia y meningoencefalitis en peces (Eldar et al., 1995; Evans et al., 2006), causante de brotes de morbi-mortalidad (Mian et al., 2009). Adicionalmente, se considera como la especie más común en peces de aguas cálidas bien sean dulces, marinas o estuarinas (Evans et al., 2002). Fue reportado por primera vez en Shiners de agua dulce en cautiverio en 1966 (Robinson & Meyer, 1966). Ha sido reportada en peces de 7 países en 2 continentes; Estados Unidos, Honduras y Brasil (América), Israel, Japón, Kuwait y Tailandia (Asia). Este patógeno también se ha aislado de 17 especies de peces como trucha arco iris, dorada, tilapia, jurel, pez gato, corvina, killfish, lacha sp., salmonete sp. y palometa plateada (Wilkinson et al., 1973; Plumb et al., 1974; Rasheed y Plumb, 1984; Elliot et al., 1990; Baya et al., 1990; Eldar et al., 1995; Vandamme et al., 1997; Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Suanyuk et al., 2005; Salvador et al., 2005; Evans et al., 2006a; Kim et al., 2007; García et al., 2008).

En 1999 se identificó por primera vez en Colombia la estreptococosis en híbridos de tilapias de cultivo (Pulido et al., 2000). La posterior secuenciación del ADN de distintos aislamientos obtenidos de varias regiones del país demostró un 98,8% de correspondencia genómica con *S. agalactiae* y es hasta el momento el único *Streptococcus* de peces reportado en nuestro país (Jiménez et al., 2007).

1.1.2 Situación epidemiológica nacional e internacional de la estreptococosis

La estreptococosis tiene muy pocas limitaciones de fronteras geográficas ó de especificidad de huésped (Bromage et al., 1999). Desde que el primer caso de esta enfermedad fue reportado en trucha arcoiris *O. mykiss* en el Japón por Hoshina et al. (1958), *S. iniae* y *S. agalactiae* han sido reportados en 23 países de los cinco continentes, especialmente en regiones tropicales que cultivan peces de aguas cálidas. Hasta el año 2012 *S. agalactiae* había sido reportado en siete países de 2 continentes: Estados Unidos, Israel, Japón, Kuwait, Tailandia, Brasil, Colombia. (Bercovier et al., 1997; Perera et al., 1997; Shoemaker and Klesius, 1997; Bowser et al., 1998; Bromage et al., 1999; Pulido et al., 1999; Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Klesius et al., 2006; Russo et al., 2006; Mian et al., 2009). Recientemente se han reportado brotes de la enfermedad en países como Honduras, Costa Rica, China y Australia. (Bowater et al., 2012; Delannoy et al., 2013; Pridgeon and Zhang, 2014).

En la actualidad se ha determinado una diversidad genética significativa entre los aislamientos de *S. agalactiae* de peces provenientes de diversas regiones geográficas como también entre los aislamientos de peces y otras especies animales incluyendo los humanos (Zhao et al., 2006; Fuster et al., 2008; Suanyuk, et al., 2008). A pesar de la diversidad genética existente, se ha demostrado la capacidad de aislados de *S. agalactiae* de humanos y bovinos, de infectar y causar enfermedad y mortalidad en Tilapias (Pereira et al., 2010).

En Colombia se ha detectado la bacteria en híbridos de tilapia roja (*Oreochromis* spp.), tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), en los departamentos del Tolima, Huila, Valle del Cauca, Meta y Casanare. Hasta el momento, de los *Streptococcus* reportados internacionalmente, solamente se ha logrado identificar

en el país el *S. agalactiae*, por medio de la técnica de PCR a partir de aislamientos obtenidos de brotes de enfermedad (Pulido et al., 1999; Iregui et al., 2004; Jiménez et al., 2007; Hernández et al., 2009).

La transmisión de la estreptococosis es principalmente horizontal, por contacto directo con peces infectados ó alimento fresco contaminado. La principal fuente de infección son las bacterias liberadas al agua por los peces enfermos o muertos (Kitao, 1993; Shoemaker and Klesius, 1997, Vendrell et al., 2006, Mian et al., 2009). La principal vía de ingreso de *S. agalactiae* a los peces es a través del tracto gastrointestinal (Iregui et al., 2013; Iregui et al., 2016). Esto se ha comprobado experimentalmente a través de ensayos de inmersión y cohabitación de peces sanos con enfermos (Prieta et al., 1993; Ferguson et al., 1994; Chang and Plumb, 1996; Perera et al., 1997; Bromage et al., 1999; Shoemaker et al., 2000; Iregui et al., 2014; Iregui et al., 2016). Así mismo, se ha replicado el proceso inoculando la bacteria en las narinas (Evans et al., 2000), por inyección intramuscular e intragástrica (Sugiyama et al. 1981; Kusuda and Salati, 1993; Neely et al., 2002) y por las branquias (McNulty et al., 2003; Mian et al., 2009). Otros factores desencadenantes de la transmisión de la enfermedad son: el desplazamiento y alimentación en grupo en cercanía a peces muertos, el canibalismo de los ojos y vísceras (Plumb et al., 1974); la utilización de peces crudos en la alimentación de otros peces en cultivo (Toranzo et al., 1994; Domenech et al., 1996); el concentrado contaminado con la bacteria (Brangg and Broere, 1986). El agua, fango y los peces que sobreviven a los brotes de enfermedad han sido identificados como potenciales reservorios de la bacteria (Toranzo et al., 1993; Akhlaghi et al., 1996; Shoemaker and Klesius, 1997; Bromage et al., 1999).

El mantenimiento de la enfermedad en una población ocurre gracias a la existencia de portadores aparentemente sanos, estado que ha sido demostrado en salmón, trucha arco iris, striped bass y tilapia (Toranzo et al., 1993; Eldar et al., 1995; Akhlaghi et al., 1996; Romalde et al., 1996). Los peces enfermos o clínicamente sanos eliminan la bacteria vía intestinal o cuando mueren, permitiendo de esta manera la infección de peces sanos e iniciar así un nuevo ciclo de vida bacteriano (Múzquiz et al., 1999).

El aislamiento de *Streptococcus* sp. del fango y de crustáceos presentes en una granja con problemas severos de estreptococosis puede indicar que esta bacteria es un

habitante normal del ambiente, que ha sido liberada y mantenida constantemente en el medio, por animales infectados subclínicamente. Otros organismos, como los crustáceos, especies ícticas ajenas a la explotación o especies terrestres predatoras, pueden actuar como reservorio de la infección (Bragg and Broere, 1986). Algunos parásitos como las sanguijuelas (*Batracobdelloides tricarinata*) también se consideran posibles vectores de la bacteria (Bragg and Broere, 1986). La movilización de animales entre granjas puede ser también un mecanismo de difusión (Kitao, 1993). Condiciones experimentales de bajo oxígeno disuelto, altas concentraciones de amonio, nitritos y nitratos, elevadas temperaturas y distintas prácticas de manipulación desencadenan la diseminación de la enfermedad y la morbilidad (Eldar et al., 1995). Algunos autores reportan como importantes factores de riesgo el aumento de la temperatura del agua, el aumento del pH, la disminución del oxígeno disuelto y las densidades altas (Perera et al., 1997; Shoemaker et al., 2000; Vendrell et al., 2006; Mian et al., 2009).

Otros factores que probablemente incrementan el riesgo de infección son: el gran número de protozoarios y tremátodos en branquias y piel, altas densidades y pobre calidad del agua (Baya et al., 1996).

1.2 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus del Grupo Lancefield B (GBS) o *Streptococcus agalactiae* es una bacteria Gram positiva encapsulada la cual exhibe β hemólisis en agar sangre. Fue identificado a partir de muestras de leche de vaca y como causa de mastitis en bovinos antes del año 1930. El interés por la patogenesis de GBS se inició en la década de 1960, cuando se centró la atención en la meningitis neonatal causada en humanos por este microorganismo (Jones et al., 1968). En 1970, un gran número de publicaciones estuvieron enfocadas a la colonización, respuesta inmune, tratamiento con antibióticos y diagnóstico de infecciones por GBS en vacas y humanos. (Paredes et al., 1976; Schauf et al., 1976). En la década de los 80 las investigaciones se enfocaron en dilucidar factores de virulencia específicos, tales como el polisacárido capsular sialilado, toxinas y proteínas de superficie (Wilkinson et al., 1978; Gibson et al., 1999; Spellerberg et al., 1999). El estudio de la patogénesis de GBS ha progresado a una nueva era en este milenio.

Se clasifica en diez serotipos (Ia, Ib, II al IX) por diferente antigenicidad del polisacárido capsular (Cieslewicz et al., 2005; Slotved et al., 2007). Es un patógeno oportunista que puede ser portado de forma asintomática en los tractos genitales y gastrointestinales inferior de madres humanas embarazadas y transmitirse a los bebés en el útero o durante el parto, a través del tracto vaginal o por aspiración. Causa enfermedades graves como meningitis, neumonía y septicemia en las madres y los niños (Mullaney et al., 2001). Se ha reportado como un comensal del tracto gastrointestinal y genitourinario de hasta el 30% de adultos sanos y es la causa principal de infecciones neonatales invasivas en los países industrializados (Phares et al., 2008; Manning et al., 2009).

La infección neonatal por *S. agalactiae* se puede presentar de dos formas: forma de aparición temprana (early onset disease - EOD) y forma de aparición tardía (late onset disease - LOD). La forma de presentación temprana va desde el nacimiento hasta los 7 días de edad, pero tiene un promedio de presentación entre las 6-8 horas de vida. Los neonatos afectados pueden presentar neumonía e insuficiencia respiratoria complicada por infección del torrente sanguíneo, septicemia y shock séptico (Cowgill et al., 2003; Baker y Edwards, 2001). Estos casos son el resultado de una infección ascendente de la bacteria a través de las membranas de la placenta para iniciar la infección en el útero o en su defecto, por la aspiración de secreciones vaginales infectadas durante el proceso del parto. Los bebés con bajo peso al nacimiento o prematuros tienen mayor riesgo de desarrollar una infección de aparición temprana. La infección placentaria por GBS a menudo desencadena parto prematuro. La segunda forma de presentación de la enfermedad (forma de aparición tardía - LOD) ocurre en una etapa posterior de la vida y va desde una semana a tres meses después del parto (Cowgill et al., 2003), incluso se reporta en bebés de hasta 7 meses de edad (Baker y Edwards, 2003). En esta etapa GBS entra al torrente sanguíneo y atraviesa la barrera hematoencefálica e infecta el sistema nervioso central, causando meningitis (Cowgill et al., 2003).

GBS también puede afectar personas adultas, especialmente aquellas personas que presentan enfermedades subyacentes como diabetes, deterioro neurológico, cáncer de mama y cirrosis. En estos la forma de presentación incluye neumonía, infección de tejidos blandos, e infección de articulaciones y huesos. En casos particulares, infección por GBS puede progresar a fascitis necrotizante y síndrome de shock tóxico. Estudios de asociación también encontraron que los adultos con condiciones predisponentes como

diabetes mellitus son más propensos a infecciones de tejidos blandos y el síndrome de shock tóxico (Sendi et al., 2008). Adicionalmente, estudios epidemiológicos mostraron que las cepas más invasoras pertenecen a los serotipos Ia, III y V, mientras que el serotipo III ha sido el principal asociado con enfermedad invasiva y meningitis neonatal (Tyrrell et al., 2000).

La tasa de mortalidad en adultos se aproxima al 15% en los países de América del Norte, Asia y Europa (Phares et al., 2008; Chaiwarith et al., 2011). La incidencia de la enfermedad por GBS en mujeres adultas no embarazadas ha aumentado en los últimos años (Chaiwarith et al., 2011). Los factores que impulsan la aparición de la enfermedad en adultos, son pobremente entendidos (Delannoy et al., 2013).

GBS es también un problema significativo en agricultura y veterinaria, ya que puede colonizar la glándula mamaria de los rumiantes y es la principal causa de mastitis subclínica (Sorensen et al., 2010). Tiene una amplia gama de huéspedes, incluyendo animales terrestres y acuáticos, entre los que se encuentran ratones, gatos, perros, hamsters, camellos, caballos, cerdos de guinea, ranas y peces (Elliott et al., 1990; Johri et al., 2006).

Se ha demostrado que GBS causa morbilidad y mortalidad significativa entre una variedad de especies de peces de agua dulce y agua salada, incluyendo la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Salvador et al., 2005). Los signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas varían en extensión y severidad según la especie afectada; sin embargo, los más frecuentemente identificados son: letargia, dificultad en el desplazamiento, nado errático y en círculos con severa curvatura del cuerpo y rigidez dorsal, acompañados de exoftalmia y opacidad corneal, (Plumb et al., 1974; Boomker et al., 1979; Rasheed et al., 1984; Kitao, 1993; Bercovier et al., 1997; Eldar and Ghittino, 1999; Pulido, 2004). Esta signología ha sido también la predominante en casos de enfermedad en las granjas productoras de Tilapia en Colombia con brotes de *S. agalactiae* (Pulido, 2004; Hernández, 2009).

1.2.1 Formas de presentación y manifestaciones patológicas en peces

Existen dos formas de presentación de la enfermedad con características patológicas diferentes: forma sistémica (casos agudos), con mortalidad alta y súbita (Evans et al., 2002) y forma crónica con signos y lesiones más variados y severos con formación de granulomas y mortalidad baja pero insidiosa (Boomker et al., 1979; Bromage et al., 1999; Pulido et al., 2004). El cuadro clínico observado en Colombia tiende a ser un proceso crónico con bajas pero constantes mortalidades; (Pulido et al., 1999; Iregui et al., 2004).

Las lesiones macroscópicas más comúnmente observadas en la estreptococosis incluyendo la causada por *S. agalactiae* son: hígado con congestión ó palidez, y con hepatomegalia (Boomker et al., 1979; Eldar & Ghittino, 1999; Hernández, 2009). El corazón puede aparecer cubierto por un material fibrinoso (Chang and Plumb, 1996; 1996; Pulido, 2000; Hernández, 2009) y el riñón congestionado (Boomker et al., 1979; Prieta et al., 1993). En la luz intestinal y en la cavidad abdominal es común notar la presencia de fluidos sanguinolentos ó un material gelatinoso amarillo-verdoso (Plumb et al., 1974; Bragg & Broer, 1986; Hernández, 2009); hemorragias en las paredes abdominales, acúmulo de fluido sanguinolento, en ocasiones con apariencia purulenta y formación de membranas fibrinosas (Plumb et al., 1974; Rasheed et al., 1984; Eldar et al., 1995; Nieto et al., 1995; Bromage et al., 1999).

De acuerdo con la signología nerviosa característica, el cerebro se muestra como uno de los sitios primarios de infección, hecho descrito tanto para el *S. agalactiae* como para otras especies de estreptococos (Pulido et al., 2004; Hernández et al., 2009). La lesión más comúnmente reportada es una meningoencefalitis, en ocasión de carácter hemorrágico (Boomker et al., 1979; Eldar et al., 1995; Baya et al., 1996; Bercovier et al., 1997; Eldar & Ghittino, 1999). Se reporta la presencia de bacterias en el espacio perivascular y en el interior de los capilares cerebrales (Nieto et al., 1995; Eldar and Ghittino, 1999; Pulido, 2000), de igual manera, se describen lesiones más severas con áreas de malacia y presencia de granulomas meníngeos (Kaige et al., 1984; Nieto et al., 1995; Perera et al., 1997; Pulido, 2000).

El segundo órgano más afectado es el globo ocular, en el cual comúnmente se encuentra endoftalmitis y panofthalmitis fibrinonecrótica y hemorrágica severa, con presencia masiva de macrófagos y bacterias comprometiendo en ocasiones el nervio óptico (Boomker et al., 1979; Rasheed et al., 1985; Baya et al., 1996; Chang & Plumb, 1996; Perera et al., 1997; Pulido, 2000).

En el corazón se suele reportar epicarditis severa asociada a un gran número de bacterias (Ferguson et al., 1994; Baya et al., 1996; Eldar & Ghittino, 1999). Pulido et al, (1999) reportaron la presencia de granulomas por *S. agalactiae* en este órgano.

La intensidad de las lesiones y signos clínicos depende de factores relacionados con la variedad de *S. agalactiae*, dosis infectiva, cantidad de agua, temperatura, biomasa y también manejo (Chang et al., 1996).

1.2.2 Características de la bacteria

Reino: *Bacteria*, Phylum: *Firmicutes*, Clase: *Bacilli*, Orden: *Lactobacillales*, Familia: *Streptococcaceae*, Género: *Streptococcus*, Especie: *Streptococcus agalactiae*. El primer intento por diferenciar los *Streptococcus* fue probablemente hecho en 1903 por Shottmuller, quien empleó agar sangre para diferenciar las cepas β hemolíticas de las no hemolíticas (Facklam, 2002). Hasta 1933 las pruebas fenotípicas fermentación y tolerancia a condiciones de cultivo fueron las únicas usadas para diferenciarlos. Funcionalmente, los estreptococos del grupo B se clasifican como bacterias ácido lácticas homofermentativas, ya que producen ácido láctico como producto único o principal de la fermentación de carbohidratos. Cocos Gram positivos de 0.6-0.8 μm de diámetro, no motiles, no esporulados, anaerobios facultativos, no producen catalasa, ácido sulfhídrico, indol, ornitina ni oxidasa (Austin & Austin, 1985; Kitao, 1993; Perera et al., 1994). Junto con la mayoría de las otras bacterias ácido lácticas pertenecen al Phylum *Firmicutes*, orden *Lactobacillales*. Este es un orden diverso que contiene géneros bacterianos importantes industrialmente incluyendo *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Makarova et al., 2006). La familia *Streptococcaceae* incluye la especie *Enterococcus*, generalmente asociada con las heces, *Lactococcus*, asociado con las plantas y los productos lácteos, y *Streptococcus* (Makarova et al., 2006).

(sustancia C) asociados con las cepas β hemolíticas, definiendo seis grupos antigénicos A, B, C, E, F y G, lo que representó un avance para su identificación (Lancefield 1933; Facklam 2002). *S. agalactiae* es serológicamente clasificado como del grupo Lancefield B, por lo que se llama comúnmente Streptococcus del grupo B o GBS (Greenwood et al., 2002). A pesar de ser descrito como un microorganismo homofermentativo, se cree que es capaz de fermentar una variedad de fuentes de carbono para producir un número de subproductos diferentes, incluyendo lactato, acetato, etanol, formiato y acetoína. Cepas de *S. agalactiae* procedentes de bovinos son capaces de fermentar la lactosa, presente en altos niveles en la glándula mamaria; esto es con menos frecuencia visto en las cepas aisladas de humanos (Sorensen et al., 2010). El organismo es aerotolerante y puede someterse a respiración si el ambiente le supe quinona o hemo los cuales activarán la cadena de transporte de electrones (Yamamoto et al., 2006; Rezaiki et al., 2008). GBS es autótrofo para varios aminoácidos esenciales. Basados en la secuenciación del genoma parece que el *S. agalactiae* tiene un metabolismo bioenergético genéticamente similar al de *Lactococcus* (Glaser et al., 2002). Estreptococos del grupo B son sub clasificados en diez serotipos según la reactividad inmunológica del polisacárido capsular Ia, Ib, II - IX. De estos, los serotipos Ia, Ib, II, III y V son responsables de la mayoría de la enfermedad invasiva en humanos. El serotipo III es el serotipo más frecuentemente aislado de la enfermedad neonatal y se asocia con 80 % de casos de meningitis neonatal. El serotipo V es el serotipo más común aislado de Infección por GBS en adultos no gestantes (Glaser et al., 2002; Johri et al., 2006).

Numerosos métodos moleculares han sido usados para estudiar la epidemiología de *S. agalactiae*. Entre los métodos comparativos de tipificación tenemos: electroforesis de campo pulsado (PFGE), el cual es utilizado para investigaciones de brotes de enfermedad (Bishop et al., 2007; Wang et al., 2010). Para análisis genéticos de poblaciones son preferibles métodos de tipificación altamente estandarizados y portátiles, como por ejemplo multilocus sequence type (MLST), el cual se basa en la secuenciación de fragmentos internos de siete genes constitutivos del DNA, o genotipificación 3-set, la cual se basa en la secuenciación de fragmentos del genoma accesorio contenido en la bacteria. (Enright and Spratt, 1998; Maiden et al., 1998). Mediante MLST se han identificado seis principales complejos clonales (CC); CC1, CC10, CC23, CC19, CC17 y CC67 (Jones et al., 2003; Tettelin et al., 2005; Sorensen et al., 2010; Tazi et al., 2010).

De estos, el tipo de secuencia 17 (ST17) es el predominante ST aislado en casos de meningitis neonatal humana y este linaje parece representar un clon invasivo de gran éxito, por lo que es descrito como hipervirulento (Jones et al., 2003; Brochet et al., 2006; Manning et al., 2009).

Cepas aisladas de Tilapias de tres países del continente americano (Honduras (4 cepas), Colombia (4 cepas) y Costa Rica(1 cepa)) fueron analizadas mediante diversas técnicas como: prueba de hemólisis, multilocus sequence type (MLST), electroforesis de campo pulsado (PFGE), serotipificación molecular (MS), y perfiles génicos de proteínas de superficie y elementos genéticos móviles y se encontró que todas las cepas caracterizadas de los 3 países fueron no hemolíticas, pertenecientes al CC 552, ST 260 y serotipo Ib, adicionalmente fueron negativas a las proteínas de superficie y elementos genéticos móviles evaluados. Estas cepas y otros miembros de su complejo clonal únicamente han sido reportadas en poiquilotermos y hasta el momento no se han encontrado en humanos (Delannoy et al., 2013).

GBS puede crecer en medios simples, aunque los medios de cultivo usualmente empleados para el aislamiento de estas bacterias deben ser suplementados con sangre ovina desfibrinada al 5%; dentro de estos se pueden mencionar: agar tripticasa soya (TSA) (Perera et al., 1994; Baya et al., 1996; Cheng and Chen, 1998), agar triptona sangre (BTA) (Bragg and Broere, 1986; Ceschia et al., 1992), y agar infusión cerebro corazón (BHI) (Prieta et al., 1993; Nieto et al., 1995; Yuasa et al., 1999). En general, durante 18-24 h de incubación en agar sangre se obtiene el crecimiento de colonias pequeñas (0.5 -1.5 mm), blancas opacas, viscosas, redondeadas y con un borde liso (Plumb et al., 1974; Boomker et al., 1979; Bragg and Broere, 1986; Ceschia et al., 1992; Prieta et al., 1993; Perera et al., 1994; Yuasa et al., 1999). La alta viscosidad comúnmente observada de estas colonias ha sido asociada a la presencia de una cápsula muy prominente (Yoshida et al., 1996).

El empleo de medios selectivos favorece la recuperación del GBS. Se han desarrollado múltiples medios de cultivo selectivos para estas bacterias. Kitao et al., (1979) usaron caldo tioglicolato suplementado con azida de sodio (0.025%) para el aislamiento de *Enterococcus seriolicida* de agua marina y fangos alrededor de las explotaciones de

yellowtail. Otros agentes selectivos utilizados en los medios de cultivo son: gentamicina, ácido nalidíxico, colistina o cristal violeta (De la Rosa and De Cueto, 2004).

Las pruebas bioquímicas más utilizadas son el CAMP-test, la hidrólisis del hipurato y la resistencia a discos de bacitracina y cotrimoxazol, aunque ninguna de ellas es específica (Tabla 1-1). En medios de cultivo especiales, el GBS produce un pigmento de color rojo naranja que es característico, y que permite su identificación directa sin necesidad de otras pruebas. Las cepas no hemolíticas no producen pigmento (De la Rosa and De Cueto, 2004).

Tabla 1-1: Principales características de identificación de *Streptococcus agalactiae* aislado de peces.

Pruebas de identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> aislados de peces.	
Prueba	<i>S. agalactiae</i>
Gram	Cocos Gram+
Hemólisis	- ó +
Catalasa	-
Oxidasa	-
Crecimiento en NaCl 6.5%	+
Bilis esculina	-
Tolerancia a 45°C	-
Arginina	-
Ureasa	-
PYR	-
Hidrólisis del Hipurato de Na	-
Motilidad 37°C	-
Reacción Voges Proskauer	-
Asimilación de carbohidratos (sucrosa, arabinosa, lactosa, maltosa, manitol, rafinosa, sorbitol, trehalosa)	Sucrosa+

NP: Prueba no practicada.

Adaptado de (Hernández et al., 2005)

1.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la estreptococosis se basa fundamental en la presencia de los signos clínicos y el aislamiento de cocos Gram (+) de órganos internos. Una vez se obtiene el crecimiento de colonias puras en los diferentes medios de cultivo, es necesaria una confirmación más precisa mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas (Kitao, 1993; Shoemaker and Klesius, 1997).

Técnicas de inmunohistoquímica han sido utilizadas exitosamente para la identificación de *Streptococcus* sp. en trucha arco iris, yellowtail y tilapia, la inmunohistoquímica como la inmunoperoxidasa indirecta (IPI) ha mostrado una mayor sensibilidad en comparación con el aislamiento microbiológico (Bragg, 1988; Hernández et al., 2009).

En Colombia, el diagnóstico de la estreptococosis se viene realizando mediante el uso simultáneo de necropsia, histopatología, IPI, microbiología y PCR a partir de colonias bacterianas; bien sea en casos de mortalidad o en programas de monitoreo sanitario que se han realizado periódicamente con propósitos preventivos (Iregui et al., 2004).

1.2.4 Mecanismos de virulencia

Quizás el principal mecanismo de virulencia es la presencia del polisacárido (PS) de la pared celular, asociado a la capacidad de actividad antifagocítica dentro de los macrófagos del hospedero. Adicionalmente, se describen otros mecanismos de virulencia como las estreptolisinas O y S que son en esencia hemolisinas (Velasco and Yamasaki, 2002). Son varios los mecanismos de virulencia descritos, sin embargo, la cápsula es la que le confiere mayor habilidad para su permanencia en el hospedero. El potencial de virulencia de los estreptococos no es determinado únicamente por su repertorio de genes, sino que además depende de la regulación diferencial de su expresión, que a su vez obedece a las condiciones ambientales del hospedero (Olsen et al., 2009).

1.2.5 Mecanismos de adherencia de *S. agalactiae*

Como muchos otros patógenos GBS puede adherirse a la superficie de las células del huésped por unión a diferentes proteínas celulares (Spellerberg et al., 1999). Se ha demostrado que GBS se adhiere e invade las células del epitelio vaginal (Sheen et al., 2011), epitelio pulmonar y células endoteliales de la microvasculatura del cerebro

humano (Rubens et al., 1991, Rubens et al., 1992, Tazi et al., 2010) y membranas de la placenta (Tamura et al., 1994). También se ha demostrado adherencia e invasión en tejidos cultivados *in vitro* y en tejidos de organismos con infección natural. Se ha propuesto que la máxima adherencia de la bacteria a las superficies mucosas ocurre a pH ácido (Tamura et al., 1994). Interacciones de baja afinidad de la bacteria con las células epiteliales son mediadas por el ácido lipoteicoico anfifílico asociado a la pared bacteriana, mientras interacciones de alta afinidad con las células del hospedero son mediadas por una serie de proteínas hidrofóbicas superficiales de diversos tamaños sensibles a pronasa (Wibawan et al., 1992). Investigaciones recientes han revelado que estas interacciones de alta afinidad con el epitelio mediadas por proteínas, generalmente proceden a través de un intermediario: GBS se une a componentes de la matriz extracelular como fibronectina, fibrinógeno y laminina. Se conoce que estas proteínas interactúan con proteínas ancladas a las células del hospedero tales como integrinas y median la adherencia de patógenos Gram positivos (Schwartz-Linek et al., 2004). La adherencia a la matriz extracelular es un factor importante en el establecimiento de la enfermedad. Algunas cepas altamente virulentas como la ST-17 muestran propiedades mejoradas de adherencia, debido a una combinación de una proteína de superficie única HvgA (Tazi et al., 2010), regulación de unión a fibrinógeno a través del sistema de dos componentes (TCS) RgfA / C (Al Safadi et al., 2011) y una proteína Srr-2 de unión a queratina (Seifert et al., 2006). Algunas cepas presentan elementos de adhesión específicos para las especies que colonizan. Por ejemplo, cepas de la especie bovina no contienen la proteína ScpB de unión a fibronectina y la proteína Lmb de unión a laminina (Lindahl et al., 2005). El éxito de la colonización de las membranas mucosas por GBS podría inicialmente ser dependiente de la capacidad del microorganismo para interactuar con la matriz extracelular (MEC). La MEC es un componente estructural de las capas celulares epiteliales y endoteliales que consisten en glicoproteínas como colágeno, laminina, fibronectina y fibrinógeno. Interacciones iniciales de baja afinidad entre el ácido lipoteicoico de la pared celular de los microorganismos y la MEC permite a las proteínas de superficie expresadas formar uniones fuertes con los componentes de la MEC. GBS tiene numerosas proteínas de superficie implicadas en la unión a células epiteliales, endoteliales y componentes de la MEC; dos de estas proteínas que atraen el interés actualmente son el pili y la proteína HVGA la cual es una variante de BibA expresada por la cepa de GBS ST-17 que le permite incrementar la adherencia e invasión a las células del epitelio intestinal y las células de la barrera hematoencefálica, lo cual podría explicar

la estrecha asociación del clon ST-17 con la enfermedad neonatal tardía (LOD) (Tazi et al., 2010; Tazi et al., 2012). El papel del pili en la adhesión e invasión del GBS ha demostrado ser importante en la capacidad del microorganismo para adherirse e invadir múltiples tipos de células (Lauer et al., 2005; Dramsi et al., 2006; Maisey et al., 2008b). En los organismos Gram positivos se ha encontrado que el pili juega un papel importante en la adhesión celular y la formación de biofilm. Todos los aislados clínicos de GBS codifican un pili a partir de al menos uno de los dos locus, PI-1 y PI-2 (que tiene dos variantes alélicas PI2a y PI2b). Los pili de *Streptococcus* del grupo B son estructuras triméricas; una subunidad menor PilC forma la base, subunidades covalentemente unidas de la pilina principal PilB forman la columna vertebral y PilA (la adhesina) se encuentra a lo largo de la columna vertebral y forma la punta. PilA es capaz de unirse a colágeno por un tipo de dominio del factor Von Willebrand (Gilmore et al., 2003). El pili no siempre es esencial para la unión a células (Jiang et al., 2012), probablemente debido a los otros numerosos factores de adherencia en la superficie del organismo. Sin embargo, hay más apoyos para el papel del pili en la invasión celular (Tazi et al., 2012).

La unión a la MEC es multifactorial, ya que las proteínas que muestran propiedades de unión aisladas son prescindibles para la unión en todo el organismo (Dramsi et al., 2012). Además, muchas de las proteínas parecen tener múltiples ligandos, permitiéndole a la bacteria adherirse a una gama diversa de células.

Beckmann et al., (2002) demostraron que la serino proteasa de GBS C5a peptidasa (ScpB) media la unión de la bacteria a fibronectina. Además, le permite evadir la respuesta inmune del hospedero (Takahashi et al., 1995).

1.2.6 Regulación de la adherencia

GBS tiene un número de sistemas regulatorios que le permiten responder y adaptarse a los diferentes medioambientes encontrados en el huésped. Las proteínas implicadas en la adherencia parecen estar bajo regulación a menudo negativa. El regulador transcripcional RovS y el sistema de dos componentes CovS/R son represores de múltiples genes que le confieren a la bacteria capacidad de adherencia a diferentes células y a la MEC. Algunas cepas a las cuales se les ha hecho delección del sistema de dos componentes CovS/CovR, muestran una alta capacidad de adherencia (Lamy et al.,

2004, Jiang et al., 2005). CovS/R es un represor del factor de transcripción Rga el cual es un regulador positivo del pili y la proteína Srr-1 (Dramsi et al., 2012). Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína del pili PI-1 en cepas con delección de CoVs/R no parece contribuir a la hiper-adherencia (Jiang et al., 2012). Cepas mutantes CoVs/R también muestran sobreexpresión de proteínas de la pared celular, tales como Biba y ScpB las cuales se ha indicado que participan en la adherencia (Lamy et al., 2004, Jiang et al., 2005). Cepas con delección del factor ROV mostraron un aumento de la expresión de la proteína de unión a fibrinógeno fsbB y demostraron un incremento en la unión a células epiteliales y fibrinógeno (Samen et al., 2006). La regulación de la unión a fibrinógeno a través de la TCS RgfA/C ha sido implicado como un factor que conduce a hiper-adherencia en cepas altamente virulentas ST-17 (Al Safadi et al., 2011).

1.2.7 Mecanismos de invasión del *S. agalactiae*

Se ha encontrado que durante la infección sistémica GBS atraviesa el epitelio pulmonar, endotelio, la barrera hematoencefálica (BBB) y el epitelio intestinal, logrando acceder a los diferentes compartimentos del organismo, tales como el compartimento amniótico, torrente sanguíneo y sistema nervioso central. La translocación bacteriana de las barreras celulares puede ser a través de tres rutas: transcitosis, translocación paracelular y daño tisular. Se ha reportado que GBS puede utilizar cualquiera de los tres mecanismos. En tejidos que no presentan daño pueden utilizar la translocación transcelular y paracelular. Adicionalmente pueden utilizar sus factores de virulencia para lesionar el epitelio y diseminarse a otros tejidos (Ringø et al., 2007). Para acceder a la circulación sanguínea, el GBS debe atravesar barreras de superficies, tales como el epitelio vaginal, cervical e intestinal. Se cree que la translocación de GBS a través de las células epiteliales y endoteliales después de la adhesión se realiza por un mecanismo que requiere la participación de microfilamentos de actina (Rubens et al., 1992; Doran et al 2002). La internalización e invasión por GBS involucra una estrecha unión de las bacterias a la membrana citoplasmática y su posterior endocitosis (Valentin-Weigand et al., 1997). Se ha reportado la participación de la alfa C proteína en la translocación de GBS facilitando la infección invasiva (Baron et al., 2004).

Para causar daño tisular y destrucción de los tejidos y de esta forma atravesar las barreras epiteliales y acceder a otros órganos GBS utiliza varias toxinas y enzimas

conocidas como factores de virulencia (Cumley et al., 2012). Uno de las más importantes es la β -haemolysin/cytolysin (β -h/c), una toxina formadora de poros asociada a la superficie responsable de la zona característica de hemólisis en placas de agar sangre (Nizet et al., 1996; Nizet, 2002). Además de (β -h/c), GBS también produce factor CAMP, una segunda toxina formadora de poros cuya actividad se ve principalmente en los glóbulos rojos pre-tratados con esfingomielinasa (Sterzik and Fehrenbach, 1985). Otra proteína que fue identificada como importante para la invasión pero no para adhesión antes que el pili fuera identificado es la PilB (Adderson et al., 2003) y se cree que es importante en la ruta de translocación paracelular (Pezzicoli et al., 2008).

1.3 Modelos de estudio de la estreptococosis

No se conocen reportes sobre la interacción de *S. agalactiae* en cultivos de tejidos gastrointestinales *in vitro* en peces. En el caso de GBS de humanos se han adelantado estudios con monocultivos de células epiteliales HEp-2 y ME180 en los cuales se ha determinado la ruta de translocación utilizada por esta bacteria, demostrando el paso del microorganismo a través de la ruta transcelular y paracelular (Valentin-Weigand et al., 1997; Soriano et al., 2006). Por otro lado, se han llevado a cabo investigaciones en las que utilizan líneas celulares epiteliales pulmonares A549, epiteliales cervicales ME180 y HL, epitelial renal MDCK1 y epiteliales intestinales TC7, para estudiar la adherencia y formación de biofilm de GBS en estos epitelios (Tamura et al., 1994; Schubert et al., 2004; Konto-Ghiorghi et al., 2009).

1.4 Referencias

- Austin, B., & Allen- Austin, D. (1985). A review. *Journal of Applied Bacteriology*, 58(5), 483-506.
- Austin B, Austin DA (1999). Bacterial Fish Pathogens. *Diseases of Farmed and Wild Fish*, 3rd ed. Springer, London, pp. 457.
- Agnew, W., & Barnes, A. C. (2007). Streptococcus iniae: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary microbiology*, 122(1), 1-15.
- Akhlaghi, M., Munday, B. L., & Whittington, R. J. (1996). Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *Journal of Fish Diseases*, 19(3), 251-258.

- Al Safadi R, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, Mereghetti L, Gannier F, Quentin R, Rosenau A. Enhanced expression of Imb gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS1548 in scpB-Imb intergenic region. *PLoS ONE* 5(5): e10794.
- Baker, C., and Edwards, M. (2003). Group B streptococcal conjugate vaccines. *Archives of Disease in Childhood* 88: 375–378.
- Baron, M. J., Bolduc, G. R., Goldberg, M. B., Aupérin, T. C., & Madoff, L. C. (2004). Alpha C protein of group B *Streptococcus* binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. *Journal of biological chemistry*, 279(23), 24714-24723.
- Baya A.M., Lupiani B., Hetrick F.M., Roberson B.S., Lukacovic R., May E. & Poukish C. (1990) Association of *Streptococcus* sp. with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. *Journal of Fish Diseases* 13, 251–253.
- Baya, A.M., Navarro, R.B., and Kotopoulis, E. (1996). Streptococcal infections of hybrid striped bass and tilapia. *AES Technical Session 1: Open Papers*.
- Bercovier, H., Ghittino, C., Eldar, A., (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. In: Gudding, R., Lillehaug, R., Midtlying, P.J., Brown, F. (Eds.), *Fish Vaccinology. Developments in biological standarization* Karger, Basel, Switzerland, pp. 153–160.
- Beckmann, C., Waggoner, J. D., Harris, T. O., Tamura, G. S., & Rubens, C. E. (2002). Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infection and immunity*, 70(6), 2869-2876.
- Berridge, B. R., Bercovier, H., & Frelief, P. F. (2001). *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S–23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Veterinary Microbiology*, 78(2), 165-173.
- Bishop, C.J., Aanensen, D.M., Jordan, G.E., Kilian, M., Hanage, W. P. and Spratt, B.G. (2009). Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol* 7, 3.
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary parasitology*, 132(3), 249-272.
- Boomker, J., Imes Jr, G., Cameron, C., Naude, T., and Schoonbee, H. (1979). Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 46(2), 71-77.

- Bowater, R., Forbes- Faulkner, J., Anderson, I., Condon, K., Robinson, B., Kong, F., McPherson, G. (2012). Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. *Journal of fish diseases*, 35(3), 173-186.
- Bowser, P., Wooster, G., Getchell, R., & Timmons, M. (1998). *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(3), 335-339.
- Bragg, R., and Broere, J. (1986). Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (Denmark)*.
- Brochet, M., Couve, E., Zouine, M., Vallaey, T., Rusniok, C., Lamy, M.C., et al. (2006). Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infect.* 8 1227–1243.
- Bromage, E., Thomas, A., & Owens, L. (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36(3), 177-181.
- Bromage, E.S. and Owens, L. (2002). Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: Effect of different routes of exposure. *Diseases of Aquatic Organisms* 52(3): 199-205.
- Chaiwarith, Romanee, et al. (2011). "*Streptococcus agalactiae* in adults at Chiang Mai University Hospital: a retrospective study." *BMC infectious diseases* 11: 1.
- Chang, P., and Plumb, J. (1996). Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of fish diseases*, 19(3), 235-241.
- Cheng, W., & Chen, J.C. (1998). Enterococcus-like infections in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34(2), 103-108.
- Ceschia, G., Giorgetti, G., Giavenni, R., & Sarti, M. (1992). A new problem for Italian trout farms: streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*.
- Cieslewicz, M.J., Chaffin, D., Glusman, G., Kasper, D., Madan, A., Rodrigues, S., Fahey, J., Wessels, M.R. and Rubens, C.E. (2005). Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides *Infection and Immunity* 73, 3096–3103.
- Cowgill, K.D., Van, Beneden C., Wright, C., Beall, B., Schuchat, A. (2003). Program and

- abstracts of the 43rd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of American (San Diego, California). Alexandria, VA: Infectious Diseases Society of America; 2003. the Active Bacterial Core Surveillance Team. Burden of streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis—United States.
- Cumley, N. (2012). *The molecular basis for virulence in Streptococcus Agalactiae*. University of Birmingham.
- Cunningham, M. W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infection. *Clinical microbiology reviews*, 13(3), 470-511.
- De La Rosa M, D. C. M. (2004). *Streptococcus agalactiae*. Control Calidad SEIMC. http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/agalac.htm
- Delannoy, C.M., Crumlish, M., Fontaine., M.C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M. P., Zadoks, R.N. (2013). Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC microbiology* 13(1), 1.
- Domeénech, A., Derenaáandez- Garayzábal, J., Pascual, C., Garcia, J., Cutuli, M., Moreno, M., Dominguez, L. (1996). Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of fish diseases*, 19(1), 33-38.
- Doran, K. S., Chang, J. C., Benoit, V. M., Eckmann, L., & Nizet, V. (2002). Group B streptococcal β -hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *Journal of Infectious Diseases*, 185(2), 196-203.
- Dramsi, S., Dubrac, S., Konto-Ghiorghi, Y., Da Cunha, V., Couvé, E., Glaser, P., . . . Trieu-Cuot, P. (2012). Rga, a RofA-like regulator, is the major transcriptional activator of the PI-2a pilus in *Streptococcus agalactiae*. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), 286-297.
- Duremdez, R., Al- Marzouk, A., Qasem, J., Al- Harbi, A., & Gharabally, H. (2004). Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. *Journal of fish diseases*, 27(5), 307-310.
- Eldar, A., Bejerano, Y. and Bercovier, H. (1994). *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficilis*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology* 28:139-143.
- Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A., & Bercovier, H. (1995). Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Veterinary Microbiology*, 43(1), 33-40.

- Eldar, A., and Ghittino, C. (1999). *Lactococcus garvieae* and **Streptococcus iniae** infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Diseases of Aquatic Organism* 36:227-231.
- Elvira, B., and Almodóvar, A. (2007). Estado mundial de la pesca y la acuicultura. 154: 164-165.
- Elliott, J. A., Facklam, R. R., & Richter, C. B. (1990). Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 628-630.
- Enright, M.C., and Spratt, B.G. (1998). A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 144(11), 3049-3060.
- Evans, J.J., Shoemaker, C.A., and Klesius, P.H. (2000), Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. *Aquaculture*, 189, 197-210.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Gilbert, P.M., Shoemaker, C.A., Sarawi, M.A., Landsberg, J., Duremdez, R., Marzouk, A. Al. and Zenki, S. Al. (2002). Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal fish diseases* 25:505-513.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H., & Al-Ablani, S. (2006). First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 42(3), 561-569.
- Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 613-630.
- Ferguson, H., Morales, J., and Ostland, V. (1994). Streptococcosis in aquarium fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 19(1), 1-6.
- Ferguson, H.W., John, S., Roach, V.S., Willoughby, C.J., Parker, S., Ryan, R. (2000). Caribbean reef fish mortality associated with *Streptococcus iniae*. *Veterinary Record* 147: 662-664.
- Garcia, J.C., Klesius, P.H., Evans, J.J., and Shoemaker, C.A. (2008). Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 281, 151–154.
- Gibson, R.L., Nizet, V., Rubens, C.E. (1999). Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatric Research*

45:626–634.

- Gilmore, K. S., Srinivas, P., Akins, D. R., Hatter, K. L. & Gilmore, M. S. (2003). Growth, development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. *Infect Immun* 71, 4759–4766.
- Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Poyart, C. (2002). Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular microbiology*, 45(6), 1499-1513.
- Greenwood, D. (2012). *Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control*. New York: Churchill Livingstone: Elsevier.
- Hernández, E., Figueroa, J., & Iregui, C. (2009). Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *Journal of fish diseases*, 32(3), 247-252.
- Hoshina, T., Sano, T., and Morimoto, Y. (1958), A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of Tokyo University of Fish*, 44, 57-58.
- Iregui, C., Hernández, E., Jiménez, A., Pulido, A., Rey, A., Comas, J., Rodríguez, M. (2004). Primer mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces en Colombia. *Universidad Nacional de Colombia. Ministerio de Agricultura. Pronatta. Bogotá. Colombia*.
- Iregui, C., Barato, P., Rey, A., Vasquez, G., and Verjan, N. (2013). Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and Streptococcosis in Tilapia Fish.
- Iregui, C., Comas, J., Vásquez, G., & Verján, N. (2016). Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of fish diseases*, 39(2), 205-215.
- Jiang, S.-M., Cieslewicz, M. J., Kasper, D. L., & Wessels, M. R. (2005). Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus. *Journal of bacteriology*, 187(3), 1105-1113.
- Jiang, S., Park, S. E., Yadav, P., Paoletti, L. C., & Wessels, M. R. (2012). Regulation and function of pilus island 1 in group B *Streptococcus*. *Journal of bacteriology*, 194(10), 2479-2490.
- Jimenez, A., Rey, A., Penagos, L., Ariza, M., Figueroa, J., and Iregui, C. (2007). Estado actual de la estreptococosis en tilapias cultivadas en Colombia. *Revista Medicina Veterinaria Zootecnia* 54, 120-123.
- Johri, A.K., Paoletti, L.C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P.K., Grandi, G., and Rappuoli, R. (2006). Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development.

- Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 932-942.
- Jones, H., Everley and Howells, C.H.L. (1968) Neonatal meningitis due to *Streptococcus agalactiae*. *Postgraduate Medical Journal*, 44, 549.
- Jones, D. (1978). Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. In *Streptococci*, pp.1-49. Edited by F. A. Skinner & L. B. Quesnel. London: Academic Press.
- Jones, N., Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Oliver, K.A., Chan, M.-S., Kunst, F., Harding, R. M. (2003). Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2530-2536.
- Kaige, N., Miyazaki, T., and Kubta, S.S. (1984) The pathogen and histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail. *Fish Pathology* 19: 173-179.
- Kitao, T., Aoki, T., & Iwata, K. (1979). Epidemiological study on streptococciosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), 1: Distribution of *Streptococcus* sp. in seawater and muds around yellowtail farms [marine fish]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*.
- Kitao, T., Aoki, T., & Sakoh, R. (1981). Epizootic caused by beta-hemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathology* 15, 301-307.
- Kitao, T. (1993) Streptococcal infections. In: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR (eds) *Bacterial disease of fish*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 196-210.
- Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., Evans, J.J., (2000). Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular route in tilapia (*oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188, 237-246.
- Klesius, P., Evans, J., Shoemaker, C., Yeh, H., Goodwin, A., Adams, A., & Thompson, K. (2006). Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. *Aquaculture* 258(1), 180-186.
- Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., & Evans, J.J. (2008). *Streptococcus*: A worldwide fish health problem, 8 th *international symposium on tilapia in Aquaculture* 83-107. Cairo.
- Kusuda, R., & Salati, F. (1993). Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annual review of fish diseases*, 3, 69-85.
- Kvitt, H., and Colorni, A. (2004). Strain variation and geographic endemism in *Streptococcus iniae*. *Diseases of Aquatic Organisms* 61:67-73.
- Lamy, M. C., Zouine, M., Fert, J., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., . . .

- Trieu- Cuot, P. (2004). CovS/CovR of group B streptococcus: a two- component global regulatory system involved in virulence. *Molecular microbiology*, 54(5), 1250-1268.
- Lancefield, R.C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of experimental medicine*, 57(4), 571-595.
- Lauer, P., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Margarit, I., Maione, D., Rosini, R., . . . Grandi, G. (2005). Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus. *Science*, 309(5731), 105-105.
- Lindahl, G., Stålhammar-Carlemalm, M., & Areschoug, T. (2005). Surface proteins of Streptococcus agalactiae and related proteins in other bacterial pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 18(1), 102-127.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Caugant, D.A. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3140-3145.
- Maisey, H. C., Quach, D., Hensler, M. E., Liu, G. Y., Gallo, R. L., Nizet, V., & Doran, K. S. (2008). A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *The FASEB Journal*, 22(6), 1715-1724.
- Manning, S.D., Springman, A.C., Lehotzky, E., Lewis, M.A., Whittam, T.S. and Davies, H.D. (2009). Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in *canada*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 1143-1148.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Polouchine, N. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611-15616.
- McNulty, S.T., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., and Evans, J.J. (2003), *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. *Aquaculture*, 220, 165-173.
- Mian, G., Godoy, D., Leal, C., Yuhara, T., Costa, G., and Figueiredo, H. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 136(1), 180-183.
- Mullaney, D.M. (2001). Group B streptococcal infections in newborns. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing* 30(6), 649-658.
- Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Ortega, C., De Blas, I., Ruiz, I., and Alonso, J.L. (1999).

- Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. *Bulletin-European Association Of Fish Pathologists*, 19, 114-119.
- Neely, M., Pfeifer, J., and Caparon, M.G. (2002). Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infection and Immunity* 70(7):3904–3914.
- Nieto, J., Devesa, S., Quiroga, I., and Toranzo, A. (1995). Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of fish diseases*, 18(1), 21-30.
- Nizet, V., Gibson, R. L., Chi, E. Y., Framson, P. E., Hulse, M., & Rubens, C. E. (1996). Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infection and immunity*, 64(9), 3818-3826.
- Nizet, V. (2002). Streptococcal β -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends in microbiology*, 10(12), 575-580.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J., and Jenkinson, H.F. (2009). Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3), 407-450.
- Olivares- Fuster, O., Klesius, P. H., Evans, J., & Arias, C. R. (2008). Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. *Journal of fish diseases*, 31(4), 277-283.
- Olsen, R.J., Shelburne, S.A., and Musser, J.M. (2009). Molecular mechanisms underlying group A streptococcal pathogenesis. *Cellular microbiology*, 11(1), 1-12.
- Paredes, A., Wong, P., and Yow, M.D. 1976. Failure of penicillin to eradicate the carrier state of group B streptococcus in infants. *Journal of Pediatrics* 89, 191.
- Perera, R.P., Johnson, S.K., Collins, M.D., and Lewis, D.H. (1994). *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(4), 335-340.
- Perera, R.P., Johnson, S.K., and Lewis, D.H. (1997). Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. *Aquaculture*, 152 (1), 25-33.
- Pereira, U., Mian, G., Oliveira, I., Benchetrit, L., Costa, G., & Figueiredo, H. (2010). Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 140(1), 186-192.
- Phares, C., Lynfield, R., Farley, M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L., Petit. (2008). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *JAMA* 299: 2056–2065.

- Pier, G.B., and Madin, S.H. (1976). *Streptococcus iniae* sp. nov. a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 26: 545-553.
- Plumb, J., Schachte, J., Gaines, J., Peltier, W., & Carroll, B. (1974). Streptococcus sp. from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*, 103(2), 358-361.
- Pridgeon, J. W., and Zhang, D. (2014). Complete genome sequence of a virulent *Streptococcus agalactiae* strain, 138P, isolated from diseased Nile Tilapia. *Genome announcements*, 2(2), e00295-00214.
- Prieta, J., Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J., Collins, M., Rodríguez, U., Jones, D., Domínguez, L. (1993). Lactococcosis de la trucha arco iris. *Medicina Veterinaria* 10, 367-373.
- Pulido, A., Figueroa, J., and Castro, C.A. (1999). Reporte de streptococcosis en tilapias cultivadas en Colombia.
- Pulido, A. (2000). Evaluación clínica y fisiopatológica de un caso de streptococcosis en la explotación de tilapia roja en la Represa de Hidroprado, Tolima. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Facultad. Medicina Veterinaria Zootecnia, Ibagué.
- Pulido, E., Iregui, C., Figueroa, J., and Klesius, P. (2004). Estreptococcosis en tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas en Colombia. *Revista AquaTIC*, 20, 97-106.
- Rasheed, V., and Plumb, J.A. (1984). Pathogenicity of a non-hemolytic group B Streptococcus sp. in Gulf killifish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). *Aquaculture*, 37, 97-105.
- Rey, A., Castro, C. I., & Verján, N. (2003). Diagnóstico clínico patológico de brotes de enfermedades en tilapia roja (*Oreochromis* spp.). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 49(1), 13-21.
- Rezaïki, L., Lamberet, G., Derré, A., Gruss, A., and Gaudu, P. (2008). *Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed Group B Streptococcus to activate respiration growth. *Molecular microbiology*, 67(5), 947-957.
- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T. M., & Olsen, R. E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268(1), 251-264.
- Robinson, J.A., and Meyer, F. (1966) Streptococcal fish pathogen. *Journal of Bacteriology* 92:512.

- Romalde, J. L., Magarinos, B., Nunez, S., Barja, J. L., and Toranzo, A. E. (1996). Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 607-611.
- Rubens, C. E., Raff, H. V., Jackson, J. C., Chi, E. Y., Bielitzki, J. T., & Hillier, S. L. (1991). Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. *Journal of Infectious Diseases*, 164(2), 320-330.
- Rubens, C., Smith, S., Hulse, M., Chi, E., & Van Belle, G. (1992). Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. *Infection and immunity*, 60(12), 5157-5163.
- Russo, R., Mitchell, H., & Yanong, R. P. E. (2006). Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes. *Aquaculture* 256, 105-10.
- Salvador R, Muller EE, Freitas JC, Leonhardt JH, Pretto-Giordano LG, Dias JA. (2005). Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. *Ciencia Rural* 35(6):1374–1378.
- Samen U. M., Eikmanns B. J., Reinscheid D. J. (2006). The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infection and Immunity* 74, 5625–5635.
- Schauf, V., Deveikis, A., Riff, L., Serota, A. (1976). Antibiotic-killing kinetics of group B streptococci. *Journal of Pediatrics* 89(2):194–198.
- Schwarz- Linek, U., Höök, M., & Potts, J. R. (2004). The molecular basis of fibronectin- mediated bacterial adherence to host cells. *Molecular microbiology*, 52(3), 631-641.
- Seifert, K. N., Adderson, E. E., Whiting, A. A., Bohnsack, J. F., Crowley, P. J., & Brady, L. J. (2006). A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (ϵ) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology*, 152(4), 1029-1040.
- Sendi, P., Johansson, L., and Norrby-Teglund, A. 2008. Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults. *Infection*, 36, 100-111.
- Sherman, J. M. (1937). The streptococci. *Bacteriological reviews*, 1(1), 3.
- Shen, Z.H., Qian, D., Xiu, W.J., Gu, J.H., Shao, J.Z. (2005). Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus iniae* isolated from red drum *Sciaenops ocellatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica Journal* 29:678–683.
- Sheen, T.R., Jimenez, A., Wang, N.-Y., Banerjee, A., van Sorge, N.M., and Doran, K.S.

- (2011). Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* colonization of the vaginal tract. *Journal of bacteriology*, 193(24), 6834-6842.
- Shoemaker, C., and Klesius, P. (1997). Streptococcal disease problems and control a review. *Fitzsimmons, K.*
- Shoemaker, C.A., Evans, J.J., and Klesius, P.H. (2000). Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188(3), 229-235.
- Slotved, H.C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., Gilbert, G.L. (2007). Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2929–2936.
- Sørensen, U.B.S., Poulsen, K., Ghezzi, C., Margarit, I., and Kilian, M. (2010). Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. *MBio*, 1(3), e00178-00110.
- Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., Schnitzler, N., Lütticken, R., and Podbielski, A. (1999). Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infection and immunity*, 67(2), 871-878.
- Suanyuk N, Kanghear H, Khongpradit R, Suparnattaya K. (2005). *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) Songklanakarin *Journal Science Technology* 27: 307–319.
- Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L., & Supamattaya, K. (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(1), 35-40.
- Subasinghe R. State of world aquaculture: 2006. FAO.
- Schubert, A., Zakikhany, K., Pietrocola, G., Meinke, A., Speziale, P., Eikmanns, B. J., & Reinscheid, D. J. (2004). The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infection and immunity*, 72(11), 6197-6205.
- Soriano, M., Santi, I., Taddei, A., Rappuoli, R., Grandi, G., & Telford, J. L. (2006). Group B *Streptococcus* crosses human epithelial cells by a paracellular route. *Journal of Infectious Diseases*, 193(2), 241-250.
- Sugiyama, M., Mochizuki, H., Nimi, O., and Nomi, R. (1981). Roles of streptomycin 6-

- kinase and ribosomal affinity to streptomycin in self protection of streptomycin producer. *Biotechnology Letters* 7, 357- 362.
- Sterzik, D. J., and Fehrenbach, F.J. (1985). **Bacterial Protein Toxins** in: P. Falmagne (Ed.), *Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene, Gustav Fischer, Stuttgart* 101–108 I. ABC Suppl.15.
- Takahashi, S., Nagano, Y., Nagano, N., Hayashi, O., Taguchi, F., & Okuwaki, Y. (1995). Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. *Infection and immunity*, 63(12), 4764-4769.
- Tamura, G. S., Kuypers, J., Smith, S., Raff, H., & Rubens, C. (1994). Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infection and immunity*, 62(6), 2450-2458.
- Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., Tardieux, I. (2010). The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *The Journal of experimental medicine*, 207(11), 2313-2322.
- Tazi, A., Bellais, S., Tardieux, I., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., & Poyart, C. (2012). Group B Streptococcus surface proteins as major determinants for meningeal tropism. *Current opinion in microbiology*, 15(1), 44-49.
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., Durkin, A.S. (2005). 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*, 102(39), 13950-13955.
- Toranzo, A., Devesa, S., Heinen, P., Rianza, A., Nunez, S., & Barja, J. (1994). Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 14(1), 19-23.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1), 37-61.
- Tyrrell, G.J., Senzilet, L.D., Spika, J.S, et al., (2000). Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators. Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study—1996 *Journal of Infection Disease* 182(1):168-173.
- Vandamme, P., Devriese, L.A., Pot, B., Kersters, K., and Melin, P. (1997), *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, type Ib *Streptococcus*. *International Journal of*

- Systematic Bacteriology*, 47, 81-85.
- Valentin-Weigand, P., Jungnitz, H., Zock, A., Rohde, M., and Chhatwal, G. S. (1997). Characterization of group B streptococcal invasion in HEp-2 epithelial cells. *FEMS microbiology letters*, 147(1), 69-74.
- Velasco, Z. M., and Yamazaki, M.A. (2002). Bacterias de interés Veterinario. *Medicina Veterinaria* 19: 1-11.
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2006). Lactococcus garvieae in fish: a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 29(4), 177-198.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.
- Wang, Z., Wilhelmsson, C., Hyrsil, P., Loof, T.G., Dobes, P., Klupp, M., et al. (2010). Pathogen entrapment by Transglutaminase – a conserved early innate immune mechanism.
- Weinstein, M. R., Litt, M., Kertesz, D. A., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., . . . Willey, B. M. (1997). Invasive infections due to a fish pathogen, Streptococcus iniae. *New England Journal of Medicine*, 337(9), 589-594.
- Wibawan, I. W. T., Lämmler, C., & Pasaribu, F. H. (1992). Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. *Microbiology*, 138(6), 1237-1242.
- Wilkison, H.W., Thacker, L.G., and Facklam, R.R. (1973). Nonhemolytic group B streptococci of human, bovine, and ichthyic origin. *Infection and Immunity* 7, 496–498.
- Wilkinson, H.W. (1978). Group B streptococcal infection in humans. *Annual Review of Microbiology*.1978;32:41–57.
- Yamamoto, Y., Pargade, V., Lamberet, G., Gaudu, P., Thomas, F., Texereau, J., Poyart, C. (2006). The Group B Streptococcus NADH oxidase Nox- 2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Molecular microbiology*, 62(3), 772-785.
- Yoshida, T., Yamada, Y., Sakai, M., Inglis, V., Xie, X., Chen, S.-C., & Kruger, R. (1996). Association of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in β -hemolytic Streptococcus spp. isolated from rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(3), 223-228.

- Yuasa, K., Kitancharoen, N., Kataoka, Y., and Al-Murbaty, F.A. (1999). *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(1), 87-93.
- Zappulli, V., Mazzariol, S., Cavicchioli, L., Petterino, C., Bargelloni, L., Castagnaro, M. (2005). Fatal necrotizing fasciitis and myositis in a captive common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) associated with *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17: 617-622.
- Zhao, Z., Kong, F., Martinez, G., Zeng, X., Gottschalk, M., and Gilbert, G. L. (2006). Molecular serotype identification of *Streptococcus agalactiae* of bovine origin by multiplex PCR-based reverse line blot (mPCR/RLB) hybridization assay. *FEMS microbiology letters*, 263(2), 236-239.
- Zlotkin, A., Hershko, H., Eldar, A. (1998) Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4065–4067.
- Zubieta, D.U., Zubieta, G.U., Barbosa, C.V., & Espinosa, A. (2008). Agenda Productiva de Investigacion y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de Tilapia. Bogota: ministerio de agricultura y desarrollo rural.

Capítulo 2. Caracterización morfológica de la adherencia e invasión de *S. agalactiae* a la mucosa intestinal de la tilapia (*Oreochromis* sp.)

2.1. Introducción

Entre las principales enfermedades bacterianas de los peces, la estreptococosis es considerada la principal patología que afecta a las tilapias. En Colombia las enfermedades causadas por *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* se reportan como las de mayor incidencia para la producción de tilapia en nuestro país (Rey et al., 2003); sin embargo, el patógeno más importante desde el punto de vista sanitario, económico, social y de salud pública es *Streptococcus agalactiae*, uno de los principales agentes etiológicos relacionados con infección sistémica y meningoencefalitis en peces (Evans et al., 2006; Mian et al., 2009). Aún no se conocen las repercusiones económicas de la estreptococosis en Colombia; aún así, en el primer reporte que se hizo de la enfermedad se calcularon pérdidas por encima de 100 millones de pesos en dos y años y medio de actividad productiva (Pulido et al., 1999). Esta tendencia se ha mantenido durante el transcurso de los años, con repercusiones bastante preocupantes para industria piscícola nacional e internacional (Mata et al., 2004; Iregui et al., 2016).

Algunas sustancias para prevención y control de la estreptococosis incluyen los tratamientos antibióticos y las vacunaciones con bacterinas. Los antibióticos han incrementado la sobrevivencia de las poblaciones de peces afectadas, pero a largo plazo, los *Streptococcus* desarrollan resistencia al medicamento utilizado. Por otro lado, las vacunas: bacterinas con o sin sus productos extracelulares, confieren protección contra cepas homólogas, sin embargo, en algunos casos han favorecido el desarrollo de variantes de la misma bacteria (Verschuere et al., 2000). Como consecuencia, la estrategia más usada actualmente es el manejo de las condiciones

ambientales que prevengan el desarrollo de la enfermedad, como la disminución de la densidad de siembra y el control de la temperatura del agua (Agnew and Barnes, 2007).

Se sabe que para ingresar al hospedero, algunas bacterias patógenas deben adherirse e invadir a través de los epitelios de mucosas (Ringø et al., 2007). En el caso de *Streptococcus agalactiae* tanto en peces como en mamíferos, son pocos los estudios sobre los mecanismos de adherencia e invasión al y a través del epitelio intestinal. En tilapia, la evidencia más cercana fue reportada por Iregui et al., (2016) y Barato et al., 2016, quienes en un ensayo de inoculación intragástrica de *S. agalactiae* observaron la adhesión e invasión de la bacteria a través del epitelio gastrointestinal, proponiendo la vía oral como la principal ruta de ingreso del patógeno al hospedero. El conocimiento del mecanismo de adherencia e invasión de *S. agalactiae* en las tilapias permitirá formular estrategias de prevención y control ecológicamente viables.

En la presente investigación se estandarizó un modelo *ex vivo* de cultivo de intestino de tilapia el cual se mantuvo viable hasta por 2 horas y permitió posteriormente evaluar las primeras etapas de interacción hospedero-patógeno (adherencia e invasión) a la mucosa intestinal de la tilapia mediante la utilización de microscopía de luz: tinciones de H&E, azul de toluidina y PAS-Alcian blue, microscopía electrónica de transmisión (MET) e inmunoperoxidasa indirecta (IPI). Adicionalmente se demostró que la bacteria disminuye la expresión de la cápsula para adherirse a las células epiteliales intestinales y utiliza la ruta transcelular como la principal ruta de translocación para atravesar el epitelio. Una vez dentro de los enterocitos continúa dividiéndose. Posteriormente llega a la lámina propia, donde accede a los vasos sanguíneos para ser transportada a otros órganos. También se evaluó la respuesta de las células caliciformes, la cual se caracterizó principalmente por la secreción de mucinas neutras. Otro hallazgo importante en este estudio es que una vez *S. agalactiae* se encuentra en la luz del intestino anterior le toma entre 30 a 40min para llegar a la lámina propia.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Cultivo *In vitro* de intestino de Tilapia (*Oreochromis* sp).

Se estandarizó un modelo de cultivo *In vitro* de intestino de tilapia, el cual se utilizó posteriormente para evaluar los cambios morfológicos que se presentan en las etapas iniciales de interacción entre *S. agalactiae* y la mucosa intestinal de la tilapia *Oreochromis* sp.

Para la obtención de los anillos intestinales se emplearon 23 tilapias rojas sanas de ≥ 20 g de peso, aclimatadas durante 5 días en acuarios de 60 L, con condiciones controladas del agua: aireación permanente, temperatura de 28°C, oxígeno disuelto 6 ppm. Los animales no se alimentaron durante 5 días previos al experimento. En cabina de flujo vertical se les practicó disección en condiciones de asepsia, previo sacrificio por sobredosis de anestesia >200 ppm, con Tricaine methane-sulfonate (MS-222), finalmente se practicó sección medular. Se disectó la pared abdominal izquierda del pez, previa desinfección con yodo. Se extrajo el paquete intestinal, del cual se tomó la porción anterior (3,5 cm de longitud aprox.) y se depositó en una caja de Petri con 10 ml de medio mínimo esencial Eagle Dulbecco (DMEM) rico en glucosa; se hicieron tres lavados de la luz intestinal con DMEM a baja presión, utilizando jeringas de insulina, para eliminar restos de alimento. El segmento lavado se llevó a otra caja de Petri con 10 ml de DMEM, donde se hicieron cortes transversales de 4-5 mm de grosor manteniendo la estructura tubular del intestino. En promedio se obtuvieron 7 explantes intestinales de cada pez. Los cortes se transfirieron a medio DMEM+BSA10% y se incubaron a 28°C, CO₂ 5% y humedad relativa del 80%, durante 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 y 240 minutos, para la evaluación de la viabilidad del cultivo del organo. Se hicieron pruebas de esterilidad cultivando en medio brain heart infusión (BHI) una porción del intestino luego de los lavados. Posteriormente se seleccionaron los tiempos en los que los tejidos presentaron mejores características de viabilidad y estos tiempos se utilizaron para los ensayos de infección, en los cuales los explantes de intestino se inocularon con *S. agalactiae*. Setenta y dos explantes fueron infectados con *S. agalactiae* utilizando tres concentraciones de bacteria y tres tiempos de incubación, como se muestra en la tabla 2-1.

Tabla 2-1. División de los grupos experimentales de acuerdo a la concentración bacteriana y el tiempo de incubación.

Bacteria	Dosis	Tiempos de incubación
WT	0 ufc/ml	20, 30 y 40min
	10 ⁷ ufc/ml	20, 30 y 40min
	10 ⁸ ufc/ml	20, 30 y 40min
	10 ⁹ ufc/ml	20, 30 y 40min

Todos los experimentos con animales fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Patología Veterinaria de La Universidad Nacional de Colombia, de acuerdo con el Estatuto Nacional de Protección Animal (Capítulo VI: Animales vivos en investigación) Ley 84 de 1989.

2.2.2 *Streptococcus agalactiae* (SaTiBe08-18)

La cepa de *S. agalactiae* utilizada fue una cepa silvestre la cual expresa cápsula, (SaTiBe08-18) y hace parte del cerapio del grupo de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia. Esta fue aislada del riñón de una tilapia con streptococosis, procedente de una granja productora ubicada en el embalse de Betania, departamento del Huila. Fue caracterizada microbiológica y molecularmente como un coco Gram positivo, no hemolítico, el cual expresa cápsula, perteneciente al serotipo Ib, ST260, no expresa los genes proteicos de superficie (bac, bca, alp1, alp2, alp3, alp 4, rib) ni elementos genéticos móviles (IS1381, IS861, IS1548, ISSa4, ISSag1, ISSag2, GBSi1) propios de las cepas de humano (Delannoy et al., 2013; Barato et al., 2015). Las bacterias fueron mantenidas a -70°C en el sistema de criocongelación Cryobank® (Copan Diagnostics Inc, Corona, CA), hasta su uso.

2.2.3 Procesamiento de los tejidos por hematoxilina y eosina, inmunoperoxidasa, microscopia electrónica de transmisión Y PAS-Alcian blue

Después de la incubación de los explantes inoculados con *S. agalactiae* (SaTiBe08-18), se procedió a fijar los tejidos en formalina buferada al 10% y procesarlos para la técnica

histológica de rutina, de inclusión en bloques de parafina y tinción con hematoxilina y eosina (H&E) para la evaluación histopatológica.

La técnica de inmunoperoxidasa de los explantes inoculados con SaTiBe08-18 se realizó como lo descrito por Parson et al., (1984). Brevemente, los tejidos embebidos en parafina utilizados en la técnica de H & E, fueron seccionados a 5 µm y montados sobre láminas cargadas positivamente. Se agregó anticuerpo monoclonal producido en conejos contra el antígeno específico de *S. agalactiae* GBS22434 (Statens Serum Institut®, Copenhague, Dinamarca) y luego anticuerpo secundario anti IgG de conejo producido en cabra y marcado con peroxidasa (Sigma®, Missouri, EE.UU.). La inmunotinción se reveló con diaminobencidina SK-4105 ImmPACT® (VectorLabs, California, Estados Unidos) y los tejidos se contratiñeron con hematoxilina de Harris.

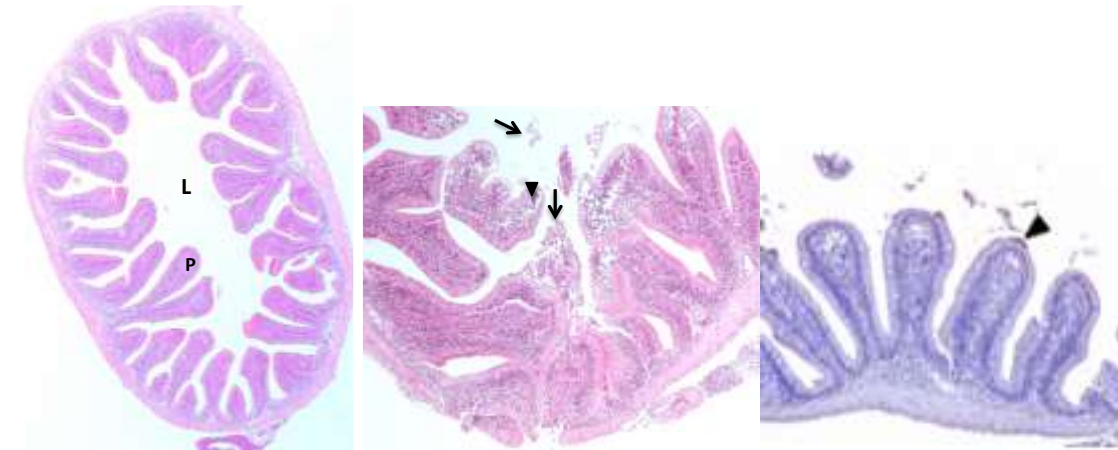
Microscopía electrónica de transmisión MET de los anillos de intestino inoculados con *S. agalactiae* (SaTiBe08-18) se realizó como lo descrito por Pujol et al. (1997). Brevemente, los anillos intestinales se fijaron en glutaraldehído fosfato al 2,5%, se post-fijaron en tetroxido de osmio al 1%, se contrastaron con acetato de uranilo y llevados a citrato. Posteriormente fueron embebidos en resina Epon 812 y analizados en un microscopio electrónico Hitachi UH-12A.

2.2.4 Evaluación histopatológica

Todos los explantes fueron analizados por microscopia óptica – H&E e IPI- por dos evaluadores de forma ciega e independiente, con el fin de establecer el porcentaje de concordancia en la calificación de cada una de las variables establecidas:

1. Detritus en la luz intestinal (Figura 2-1B)
2. Necrosis epitelial (Figura 2-1B)
3. Presencia de células inflamatorias
4. Adherencia bacteriana (Figura 2-1C)
5. Respuesta de células caliciformes
6. Presencia de mucinas acidas o neutras

Figura 2-1: Anillos intestinales cultivado *In vitro* sin bacteria e inoculados con *Streptococcus agalactiae*.



A. Fotomicrografía de un anillo intestinal cultivado *In vitro*, sin bacteria. Se aprecian los pliegues (P) y el lumen intestinal (L) H&E, 20X. **B.** Anillo intestinal cultivado *In vitro* e inoculado con *S. agalactiae*, se observa descamación epitelial severa con abundante presencia de detritus celulares en el lumen (flechas) y algunos focos de necrosis epitelial en la porción apical del pliegue (cabeza de flecha) H&E, 10X. **C.** Inmunoperoxidasa indirecta (IPI) contra GBS, se observa inmunomarcación positiva de cocos adheridos (cabeza de flecha) sobre la porción apical de los pliegues intestinales y libres en la luz (cabeza de flechas). 10X.

La evaluación de los explantes se hizo con base en el sistema de puntuación descrito por Gibson-Corley et al. (2013) con algunas modificaciones (tabla 2-2).

Tabla 2-2 Sistema de puntuación utilizado para la evaluación del modelo de infección de *S. agalactiae* en explantes de intestino de tilapia.

Parámetro: necrosis y detritus	Parámetro: adherencia	Puntuación
Escasos cambios en la arquitectura y en la actividad de las células en menos de 10 pliegues intestinales del anillo	Escasos cocos adheridos en menos de 10 pliegues intestinales del anillo	1
Escasos cambios en la arquitectura y en la actividad de las células en más de 11 pliegues intestinales del anillo	Escasos cocos adheridos en más de 11 pliegues intestinales del anillo	2
Cambios fácilmente evidentes en la arquitectura del tejido como en la actividad de las células en menos de 10 pliegues intestinales del anillo	Grupos de cocos de dos y tres filas de cadenas adheridos en menos de 10 pliegues intestinales del anillo	3
Cambios fácilmente evidentes en la arquitectura del tejido como en la actividad de las células afectadas en más de 11 pliegues intestinales del anillo	Grupos de cocos de dos y tres filas de cadenas adheridos en más de 11 pliegues intestinales del anillo	4
Cambios claramente severos en la arquitectura del tejido como en la actividad de las células afectadas en menos de 10 pliegues intestinales del anillo	Grupos de cocos de más de cuatro filas de cadenas adheridos en menos de 10 pliegues intestinales del anillo	5
Cambios claramente severos en la arquitectura del tejido como en la actividad de las células afectadas en más de 11 pliegues intestinales del anillo	Grupos de cocos de más de cuatro filas de cadenas adheridos en más de 11 pliegues intestinales del anillo	6

2.2.5 Estadística

2.2.5.1 Análisis estadístico:

Se hizo un análisis de chi cuadrado por evaluador, bacteria, dosis y tiempo para determinar la independencia de la presencia-ausencia de cada variable de rangos evaluada (adherencia, detritus y necrosis). Para severidad de la presencia de la variable observada, el modelo fue completamente al azar por evaluador (dos evaluadores), con arreglo factorial $2 \times 4 \times 3$ (dos bacterias, cuatro dosis y tres tiempos) para las variables de rangos observadas (adherencia bacteriana, detritus y necrosis celular) de tal forma que se pudiera encontrar diferencias en las bacterias, las dosis y los tiempos y de esta forma determinar la mejor dosis de inoculación y el mejor tiempo de incubación para el establecimiento del modelo de infección *In vitro* que permita caracterizar la interacción hospedero patógeno en las etapas iniciales de la infección. Este modelo estadístico tiene como supuestos: material experimental homogéneo y error experimental variable aleatorio independiente. Las hipótesis que resultaron significativas se analizaron con la prueba de Tukey. Para todos los análisis se utilizó una confianza $> 90\%$. El modelo permite probar las hipótesis de la interacción de primer y segundo orden y la de los efectos principales. A continuación, se presenta la de segundo orden:

Para la prueba de chi cuadrado de la (presencia-ausencia) se encontró lo siguiente:

- No hay diferencias estadísticamente significativas en la adherencia al comparar tiempo y bacteria
- Análisis de Varianza Tukey, correlación entre variables (bacteria, dosis, tiempo): diferencia estadísticamente significativa en la adherencia al correlacionar bacteria*dosis*tiempo (C1 $P=0.0322$ y C2 $P=0.0195$). Los otros parámetros no tienen diferencias estadísticamente significativas
- La concordancia entre evaluadores fue $>$ del 90% (valor κ superior a $0,90$).

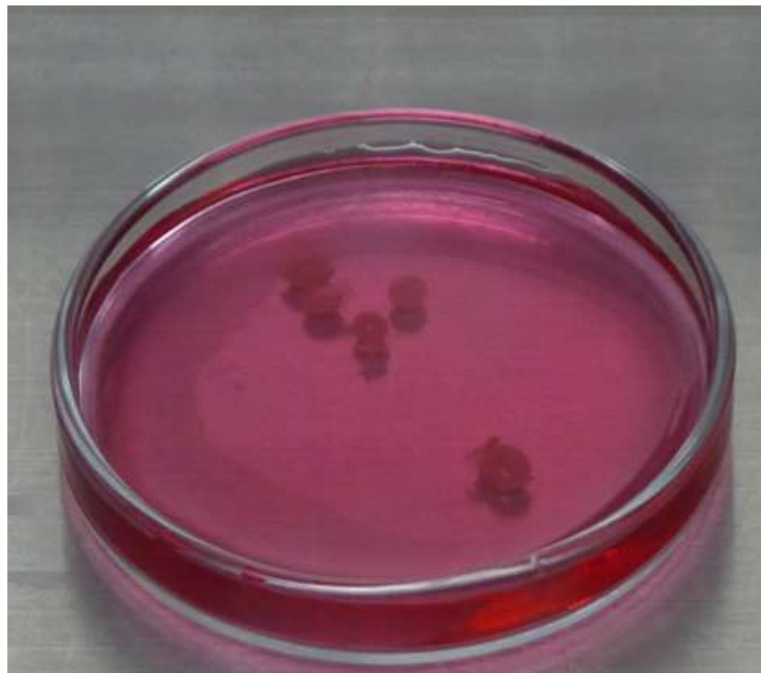
2.3 Resultados

2.3.1 Estandarización del cultivo *ex vivo* de intestino

En esta investigación se logró estandarizar un cultivo *ex vivo* de intestino de tilapia el cual macroscópicamente mantuvo la estructura tubular y tridimensional del órgano (Figura. 2-2). Se logró mantener la viabilidad del tejido hasta por dos horas en medio DMEM rico en

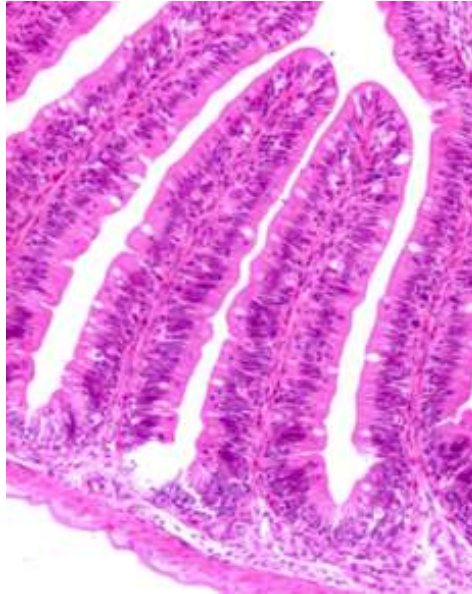
glucosa, suplementado con BSA al 10%. No se observaron alteraciones en los parámetros histológicos evaluados: homogeneidad en la longitud y el ancho de los pliegues intestinales, homogeneidad en el tono de tinción por H&E de los pliegues intestinales, refringencia del borde en cepillo, espacios entre enterocitos; necrosis de enterocitos, eosinofilia intensa de enterocitos, infiltración de linfocitos entre enterocitos arquitectura de la lámina propia y tinción de la lámina propia hasta los 120 minutos de incubación (Figura 2-3A); mientras que los explantes mantenidos hasta 240 minutos de incubación mostraron cambios de alteración en la viabilidad del tejido, como necrosis de enterocitos, acumulo de fluido en lámina propia, presencia de detritus celulares en la luz del intestino desprendimiento del epitelio. También se observó enterocitos hipereosinofílicos algunos presentaban separación entre ellos (Figura 2-3B).

Figura 2-2: Fragmentos de intestino de tilapia mantenidos en medio mínimo esencial DMEM.

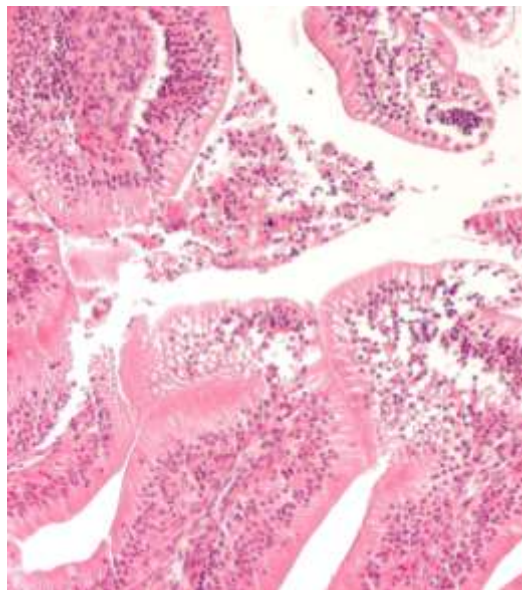


Cultivo *ex vivo* de intestino de tilapia. Caja de petri con 10ml de medio minimo esencial DMEM rico en glucosa y suplementado con BSA al 10%, la cual contiene 5 fragmentos del órgano de 5mm de longitud, estos conservan la estructura tridimensional del órgano, incluyendo el espacio luminal.

Figura 2-3: Intestinos de tilapia mantenidos en incubación durante 120 y 240 minutos.



A. Fotomicrografía de intestino de tilapia mantenido *ex vivo* durante 120 minutos de incubación; se observa una relativa “homogeneidad” en el ancho y largo de los pliegues, en el tono de la tinción, H & E 100X.



B. Fotomicrografía de un intestino de tilapia mantenido *ex vivo* durante 240 minutos de incubación. Se observan cambios de alteración en la viabilidad del tejido, como desarreglo de la arquitectura de los pliegues, muerte de enterocitos: extensas áreas de autolisis; hipereosinofilia de enterocitos, extensas áreas de desarreglo y desprendimiento

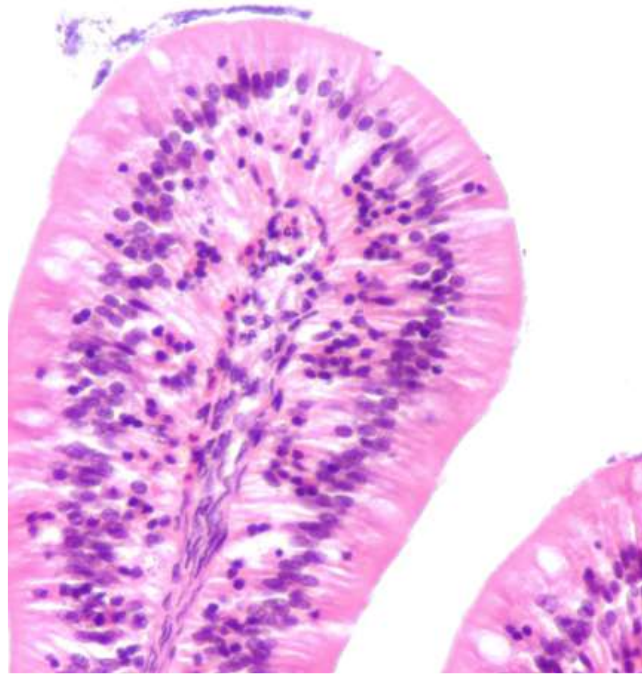
del epitelio y aumento en los espacios intercelulares; abundantes detritus celulares en la luz del intestino H & E 200X.

Este modelo sirvió como una herramienta apropiada para realizar los ensayos de infección inoculando el *S. agalactiae* en los explantes y de esta forma caracterizar los cambios morfológicos que se presentan en las etapas iniciales de la interacción de este patógeno con el hospedero.

2.3.2 Caracterización morfológica de la adherencia e invasión de *S. agalactiae* a la mucosa intestinal de tilapia

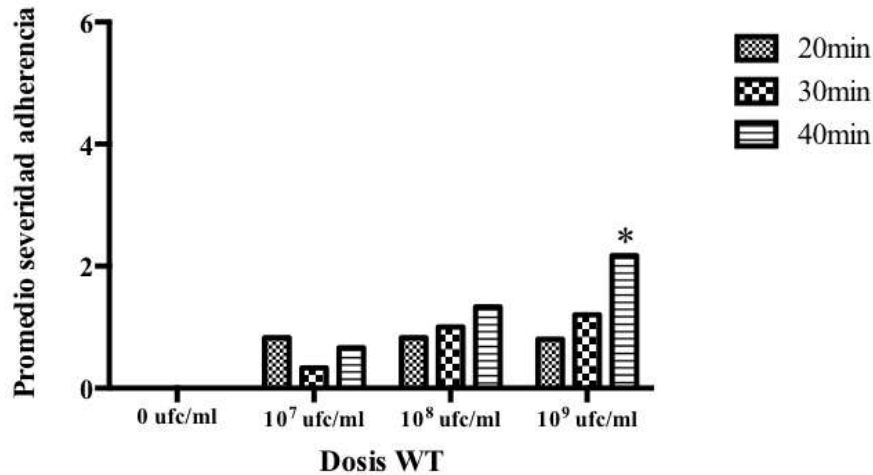
Para esta caracterización se estandarizó un modelo de infección *ex vivo* con *S. agalactiae* SaTiBe08-18 en los explantes intestinales de tilapia. Respecto a la adhesión de *S. agalactiae* se obtuvo un porcentaje de acuerdo entre observadores alto (valor κ superior a 0,90). La adherencia de *S. agalactiae* a la superficie apical de las células epiteliales intestinal fue dependiente de la dosis bacteriana y el tiempo de incubación ($P < 0,05$). Como en los primeros experimentos de infección se observó poca o ninguna adherencia de la bacteria al epitelio intestinal, fue necesario lavarla en un medio ácido, (solución salina estéril pH 5) de esta manera se logró la adherencia de la bacteria al epitelio intestinal de los explantes (Fig. 2-4).

Figura 2-4: Adherencia de *S. agalactiae* SaTiBe08-18 (WT) al epitelio intestinal de la tilapia, después de lavar la bacteria en SSF pH 5. H & E 400X.



Se comparó la adherencia entre tres tiempos de incubación (20, 30 y 40min) y tres dosis de concentración bacteriana (10^7 , 10^8 y 10^9 UFCml⁻¹) (Figura 2-5). Se encontró que *S. agalactiae* se adhirió de manera significativa al epitelio ($P < 0,05$) de una manera dosis dependiente, es decir, que la > adhesión se logró a 10^9 UFCml⁻¹ y también fue tiempo dependiente, a los 40 minutos de incubación, con un promedio de adherencia de 2,17, que varió de 1 a 3, (Figura 2-5).

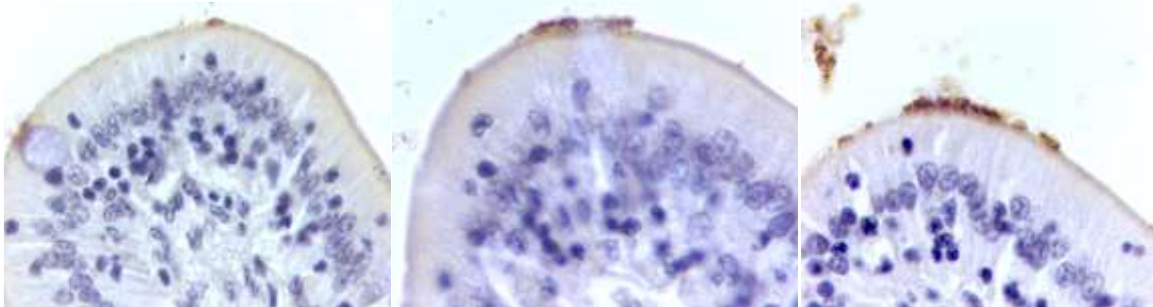
Figura 2-5: Comparación de adherencia entre tres tiempos de incubación (20, 30 y 40min) y tres dosis de concentración bacteriana (10^7 , 10^8 y 10^9 UFCml⁻¹). El asterisco se refiere a adherencia significativa al epitelio intestinal respecto al control negativo (0UFCml⁻¹) durante el mismo tiempo de incubación $*=P<0.05$.



* P<0.05 Vs POS

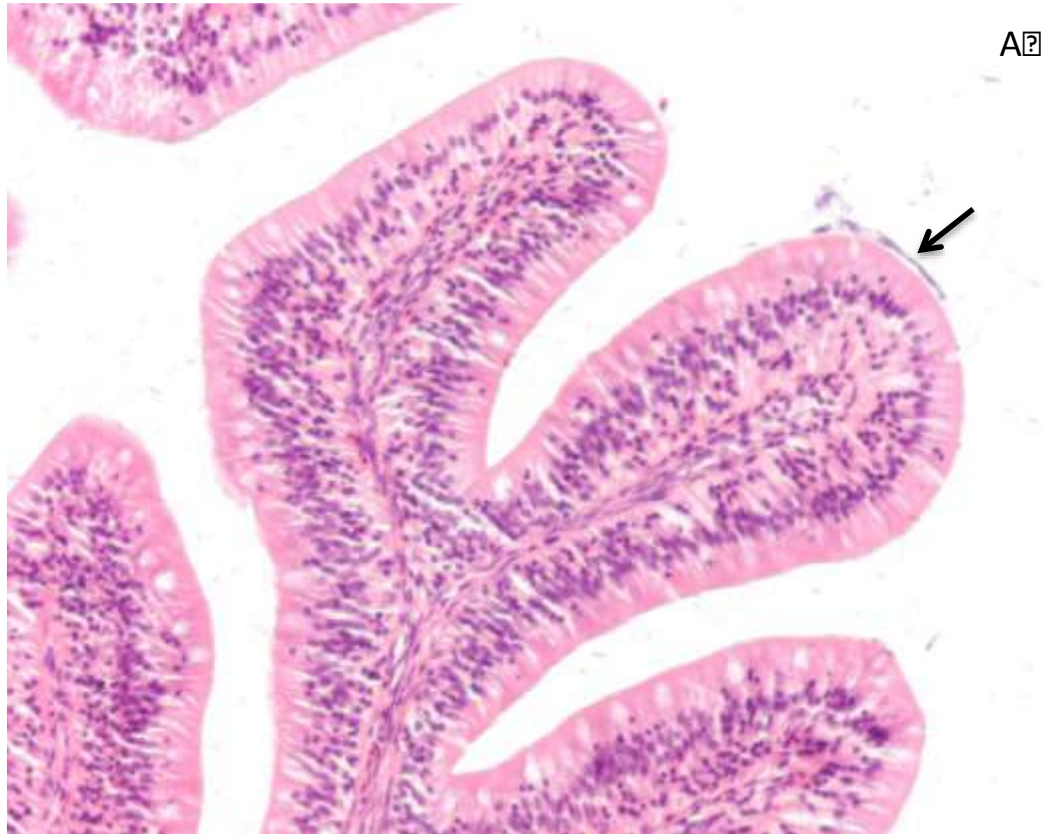
De acuerdo con el sistema de calificación mostrado en la tabla 2-2, la adhesión bacteriana fue puntuada de 1 a 6 dependiendo la cantidad de bacterias adheridas sobre un pliegue y el número de pliegues comprometidos. En la figura 2-6 se muestran 3 grados de severidad en la adhesión 1, 3 y 5. Los grados 2, 4 y 6 corresponden a la misma severidad en la adhesión (1=2, 3=4 y 5=6) pero varían en la extensión (más de 11 pliegues comprometidos).

Figura 2-6. Fotomicrografías que ejemplifican tres grados diferentes de adhesión de *S. agalactiae* (SaTiBe08-18) al epitelio intestinal de la tilapia. Leve (1), moderado (3) y severo (5), IPI 1000X.

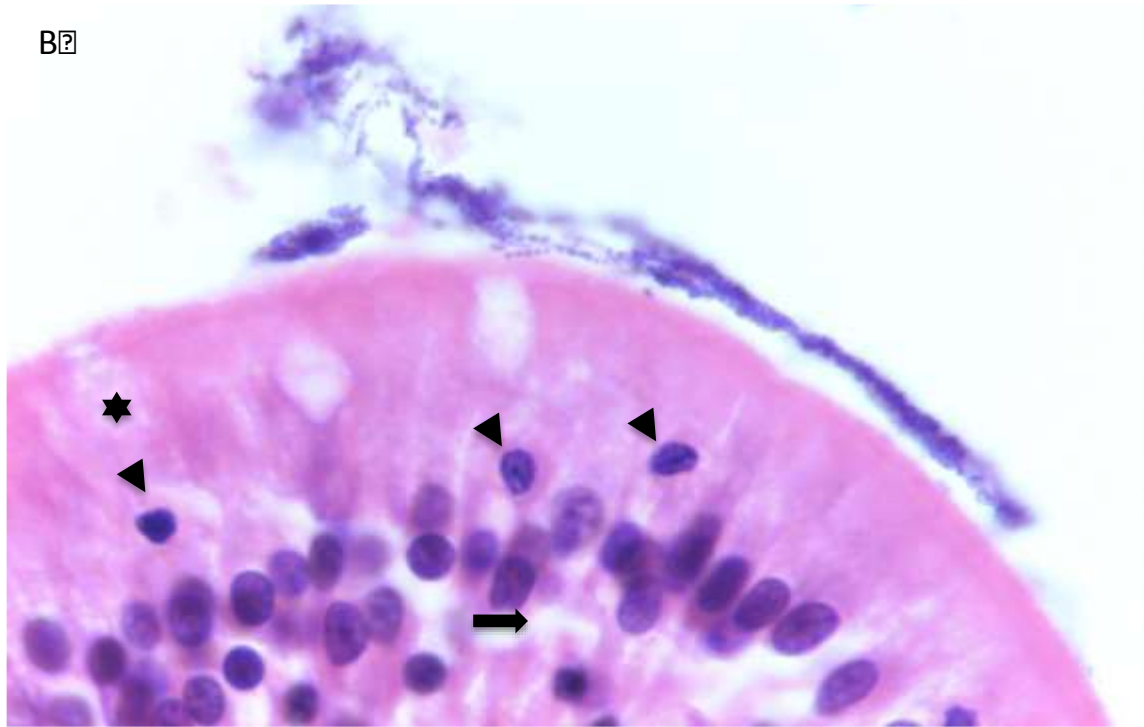


Microscópicamente se observó la bacteria en el lumen intestinal desde los 20 minutos de incubación y en contacto estrecho con la superficie epitelial a los 40 minutos, algunas veces formando cadenas y otras en agrupaciones (Figura 2-7A y B). En adición, la adhesión del patógeno al epitelio intestinal tuvo lugar principalmente sobre la porción apical de los pliegues intestinales y lo hizo en menor grado o estuvo ausente en las áreas más profundas (Figura 2-7C). Por MET se demostró que la cepa de *S. agalactiae* utilizada en la inoculación de los explantes expresa una cápsula de aspecto algodonoso que recubre la bacteria (Figura 2-8).

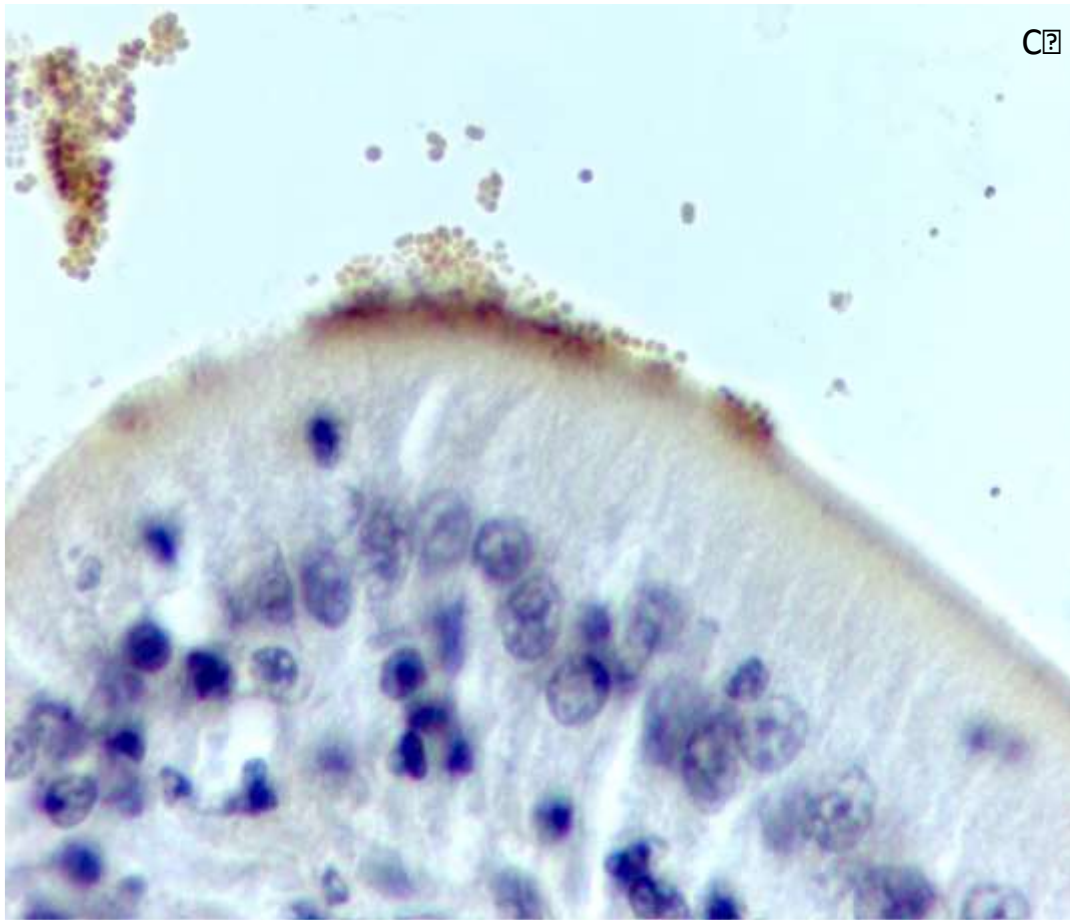
Figura 2-7: Intestino de tilapia mantenido durante 40 minutos de incubación e inoculado con 10^9 UFC de *S. agalactiae* H&E e IPI.



A. Intestino de tilapia mantenido durante 40 minutos de incubación y expuesto a *S. agalactiae*. Los pliegues muestran homogeneidad en longitud y grosor, propia de los tejidos normales, también se destaca la correcta tinción tanto de la eosina como de la hematoxilina. Nótese el escaso número y evidencias de actividad de las células de moco, las cuales muestran un espaciamiento entre ellas más o menos regular; algunos núcleos redondeados por encima de los de los enterocitos muestran de la misma forma un espaciamiento más o menos regular, se puede tratar de linfocitos intraepiteliales, esta cantidad sepuede considerar normal. Las 3 ramificaciones de un solo pliegue son frecuentes en los intestinos normales de la tilapia, aunque mayor número de ramificaciones, mayores longitudes y desigualdades, así como fusiones entre ellos se pueden considerar expresiones de patología. Un grupo de bacterias (flecha) se adhieren a la porción apical de un pliegue; no se observan microorganismos en las áreas más profundas de las ramificaciones, H & E 200X.

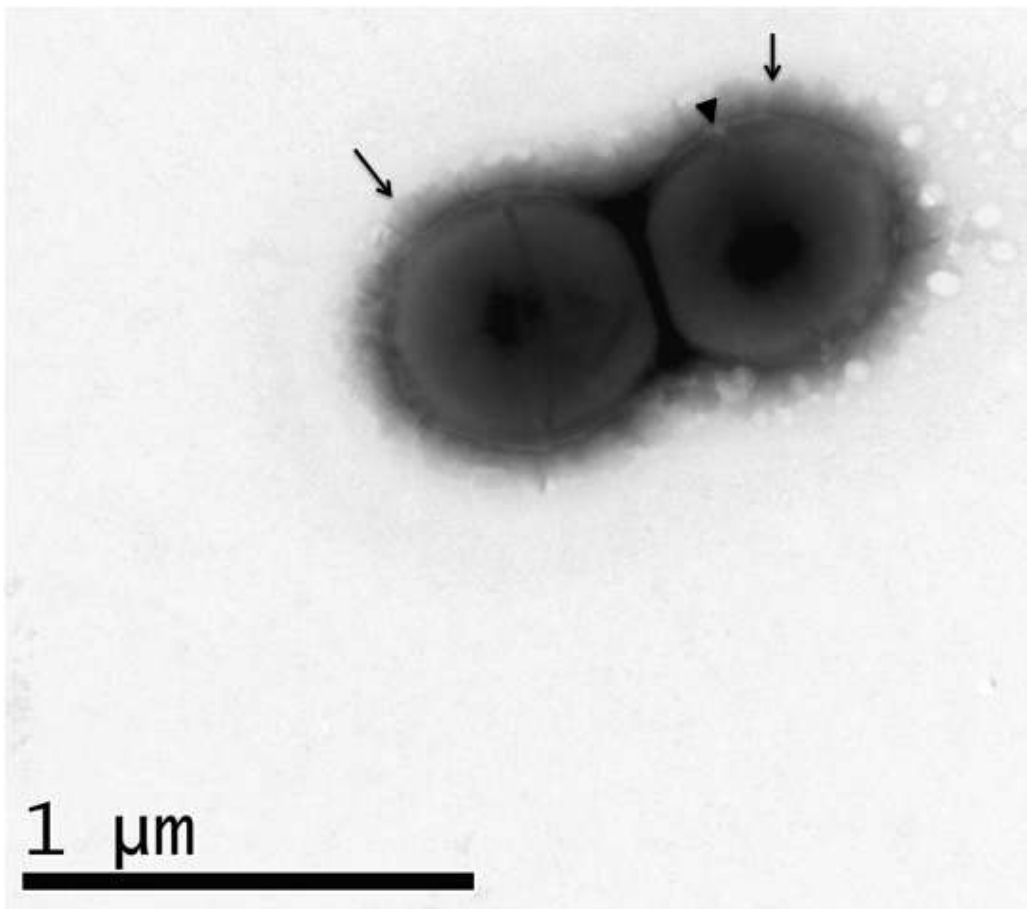


B. Aproximación de la figura anterior. Se aprecia en mayor detalle el gran número de bacterias adheridas a la superficie, algunas forman cadenas (flecha). Es evidente el buen estado tanto de los núcleos y el citoplasma de los enterocitos representados en el primer caso por buena diferenciación de la hetero y eucromatina; nótese la escasa por no decir nula respuesta de las células de moco (asterisco); las 3 cabezas de flecha señalan los que parecen ser por lo menos 3 linfocitos intraepiteliales, H & E 1000X.



C. Intestino de tilapia mantenido durante 40 minutos de incubación; además de la mayor relación de grupos de *S. agalactiae* con el epitelio y a pesar de no ser una técnica diseñada para tal fin, es de resaltar el mejor detalle de la cromatina de los enterocitos lo que indica la excelente conservación del tejido; al igual que en la figura previa se caracteriza por la ausencia de respuesta de las células de moco. Otros cocos forman grupos en la luz del intestino. IPI 1000X.

Figura 2-8: Microscopia electrónica de transmisión (MET) de SaTiBe08-18 en medio de cultivo.

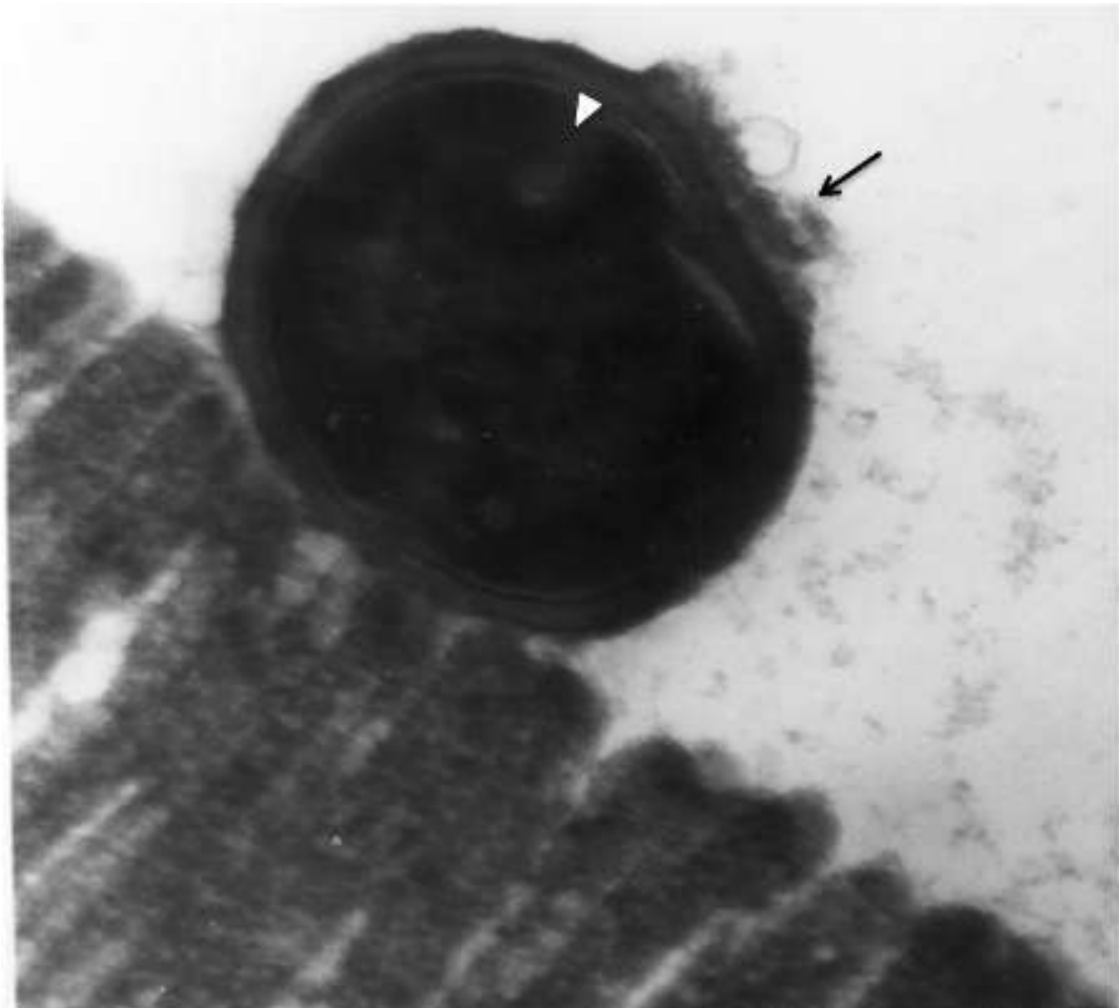


Nótese el material de aspecto “algodonoso” en la parte más externa del microorganismo (flechas), el cual corresponde a la cápsula. Adicionalmente, en el individuo de la izquierda una línea en el Ecuador lo divide en dos (tabique divisorio), mientras que en el de la derecha una especie de hendidura más notoria en la parte superior (cabeza de flecha) indican que las bacterias están en proceso de división.

Aunque el agente expresa esta cápsula cuando se encuentra libre en el lumen intestinal, fue evidente que en la medida que el patógeno se acerca a la superficie del epitelio disminuye la cantidad de cápsula sobre su superficie y una vez establece contacto estrecho con la porción apical de las células epiteliales, la cápsula prácticamente desaparece por completo o quedan escasos remanentes en la cara opuesta a la de la

adhesión (Figura 2-9A). Fue manifiesto igualmente, que los microorganismos desprovistos de cápsula una vez adosados a las microvellosidades de las células epiteliales se dividen intensamente (Figura 2-9B).

Figuras 2-9: MET de explantes de intestino de tilapia inoculados con *S. agalactiae* (SaTiBe08-18). Se aprecian diferentes cambios morfológicos durante la adherencia de la bacteria al epitelio intestinal de la tilapia.



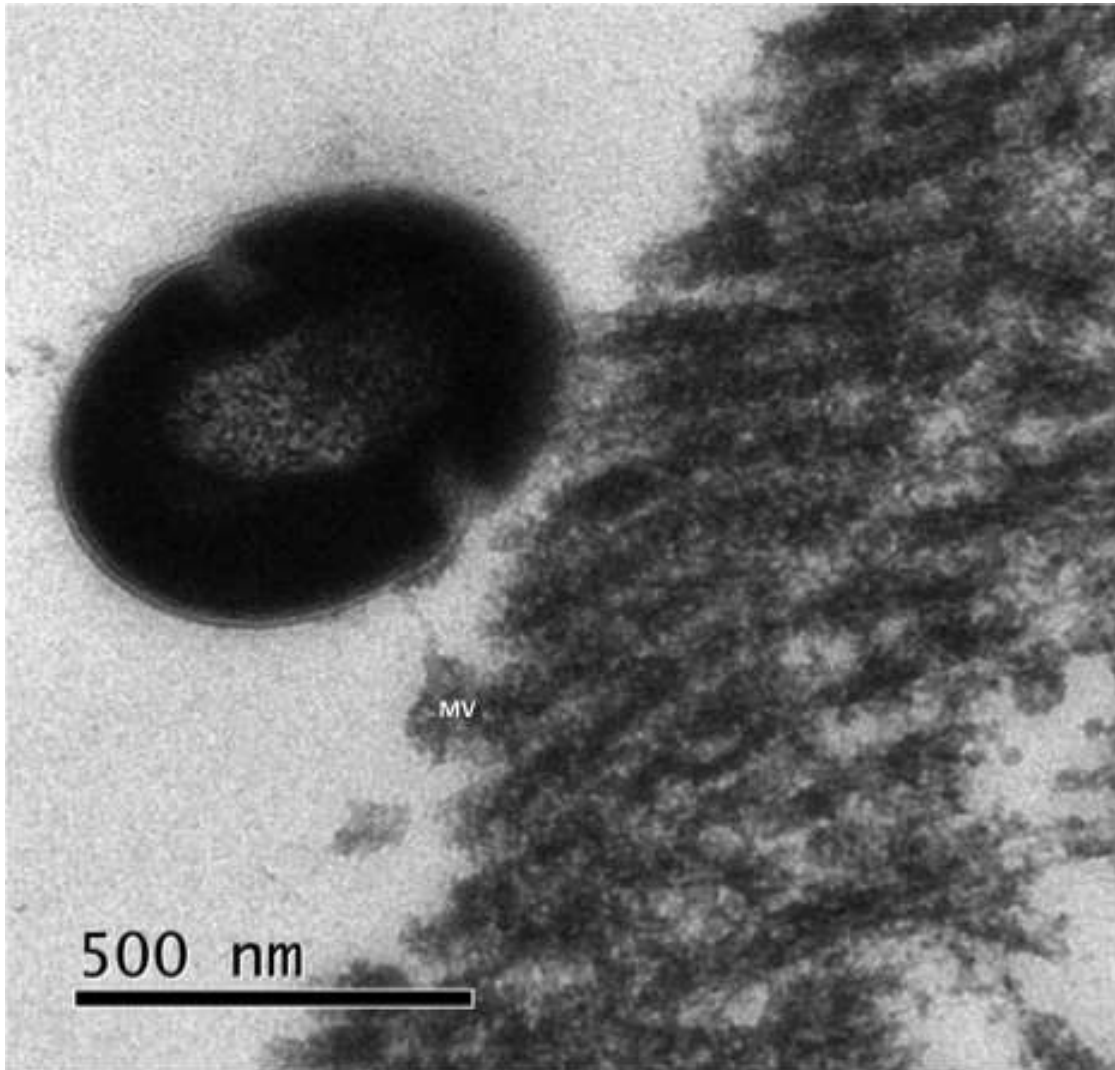
A. Un individuo se adhiere a la superficie apical de varias microvellosidades de los enterocitos. Remanente de material electrodenso de aspecto algodonoso sobre el polo opuesto al sitio de adhesión (posiblemente restos de cápsula) (flecha). Una línea ligeramente más electro-lúcida (cabeza de flecha) que la cápsula se proyecta desde ésta hacia el interior del microorganismo, indicando división celular, MET 28000 X.



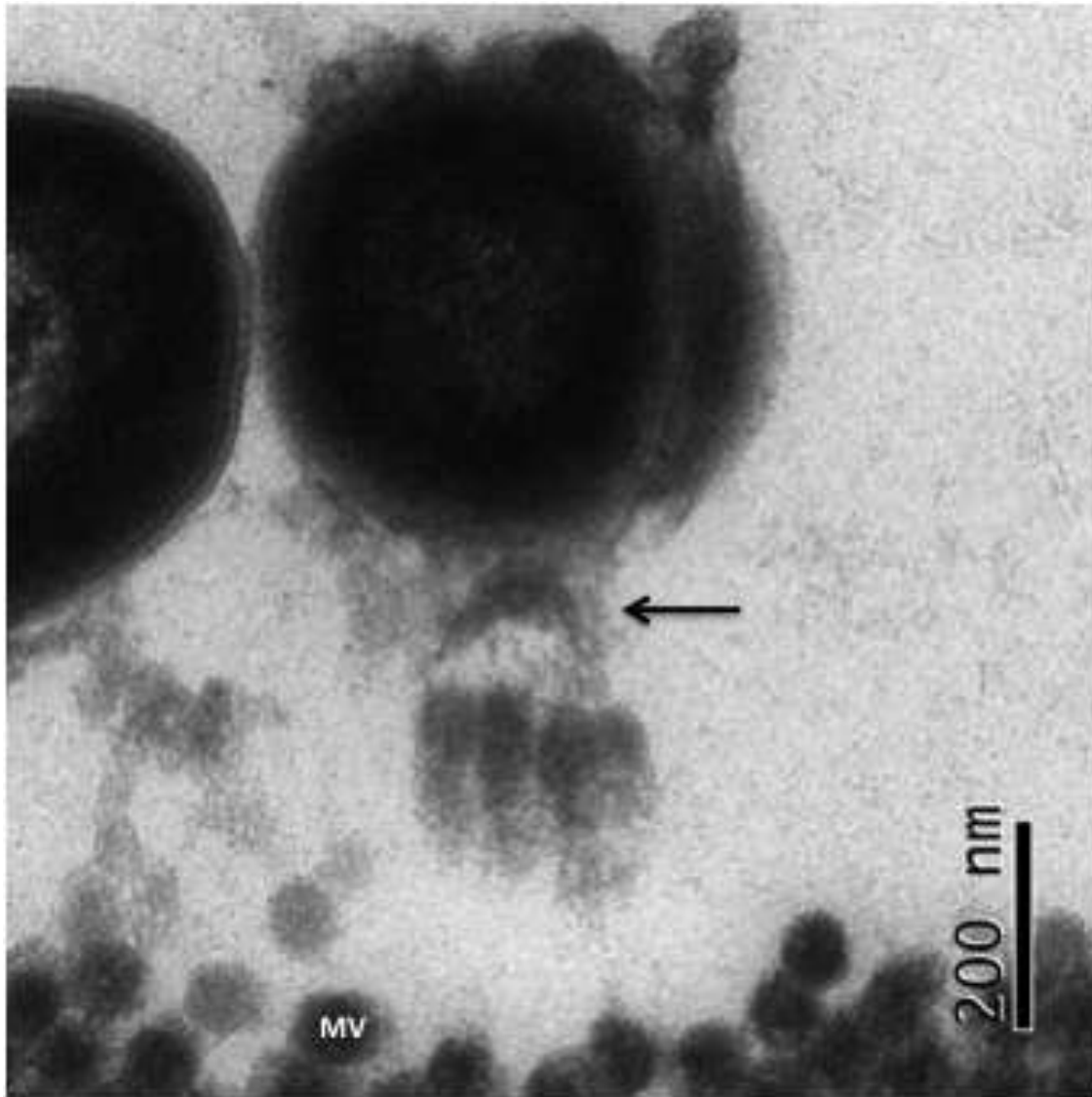
B. Tres cocos posicionados sobre las microvellosidades de los enterocitos, 2 de los cuales se están dividiendo. Igualmente carecen de cápsula, aunque ocasionalmente quedan remanentes muy escasos; las microvellosidades sobre las que se posan están ligeramente curvadas hacia los lados, MET 25000 X.

Al hacer contacto los patógenos con las microvellosidades intestinales se demostraron unas estructuras electrodensas a manera de pelos o proyecciones fibrilares (¿pili?, ¿azúcares? u ¿otras adhesinas?), que se proyectan desde la superficie bacteriana y se unen a las puntas de las microvellosidades (Figura 2-10A), algunas veces estas estructuras fibrilares parecen provocar el desprendimiento de las microvellosidades (Figura 2-10B).

Figura 2-10: MET de explantes de intestino de tilapia inoculados con *S. agalactiae* (SaTiBe08-18), mostrando estructuras fibrilares en forma de pelos.



A. Coco del cual se proyectan estructuras ligeramente electrodensas con aspecto de pelos o proyecciones fibrilares que unen al microorganismo a la superficie de una microvellosidad (MV), MET 28000 X.



B. Varias microvellosidades en corte longitudinal de menor electrodensidad que las cortadas transversalmente (MV); una estructura de forma de cuarto menguante de similar electrodensidad a la bacteria y a las microvellosidades en corte longitudinal, la cual no se puede determinar a quien pertenece si al patógeno o al enterocito (flecha), MET 28000 X.

2.3.3 Alteraciones de la mucosa en explantes infectados con *S.a.*

Por microscopia de luz se determinó que cuando gran número de cocos se adherían a la superficie de los pliegues intestinales porciones completas de epitelio del apice de los pliegues se desprenden, formando una especie de estrangulamiento, lo que deja expuesta la lámina basal y los detritus celulares, que contienen las bacterias (Figura 2-

11a y b). En otras ocasiones el daño al borde en cepillo de las células epiteliales es tan masivo que las microvellosidades se desprenden casi en su totalidad (Figura 2-12).

Figura 2-11: Estrechamiento de la porción apical de los pliegues donde se adhieren las bacterias.

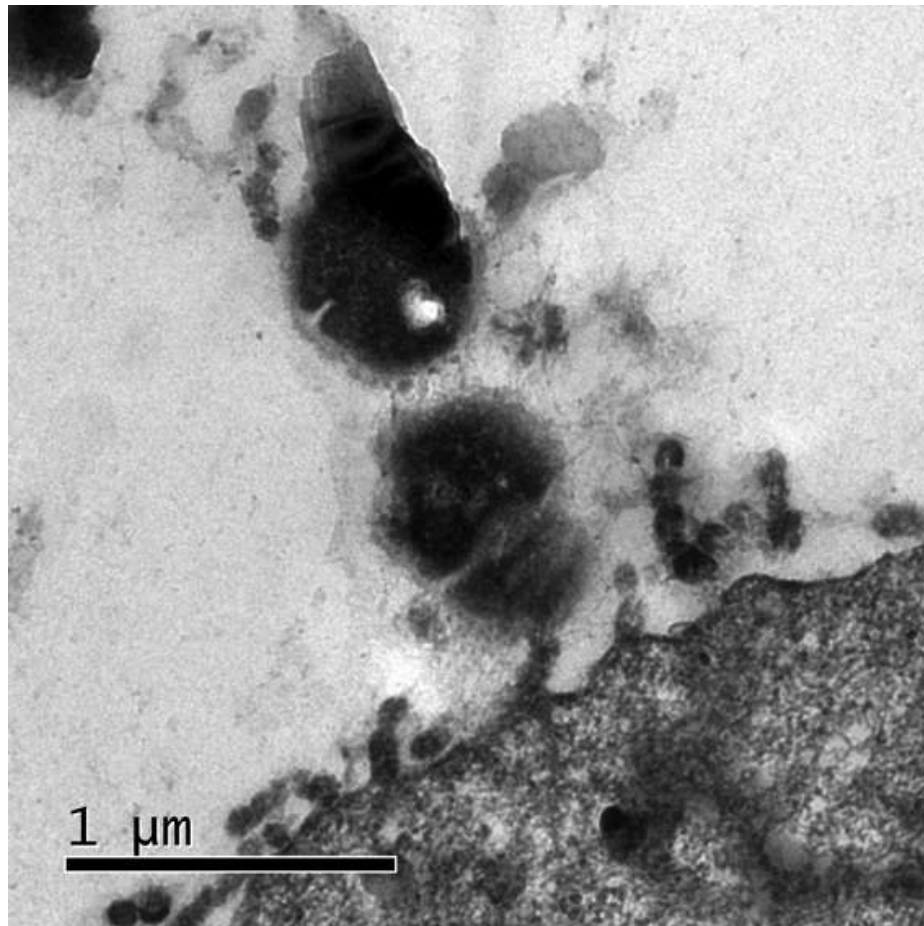


A. Porción apical de un pliegue de intestino de tilapia en el cual un grupo de cocos (cabeza de flecha) se adhieren a la superficie de los enterocitos y se presenta un estrechamiento bilateral (flechas) que inicia la separación del grupo distal de enterocitos de la porción restante del pliegue. IPI 1000X.



B. En los 2 pliegues del centro se aprecia cómo se inicia el estrechamiento (flechas) de grupos de enterocitos de la porción apical del pliegue, que eventualmente llevan a su desprendimiento. Es posible ver algunos cocos adheridos al borde en cepillo (cabeza de flecha). El pliegue del extremo izquierdo de la foto ha perdido buen parte del epitelio de revestimiento (flechas grandes). IPI 100X.

Figura 2-12: MET de un explante de intestino de tilapia inoculado con *S. agalactiae* (SaTiBe08-18) con pérdida extensa y severa de microvellosidades y un grupo de cocos posicionado sobre una microvellosidad.

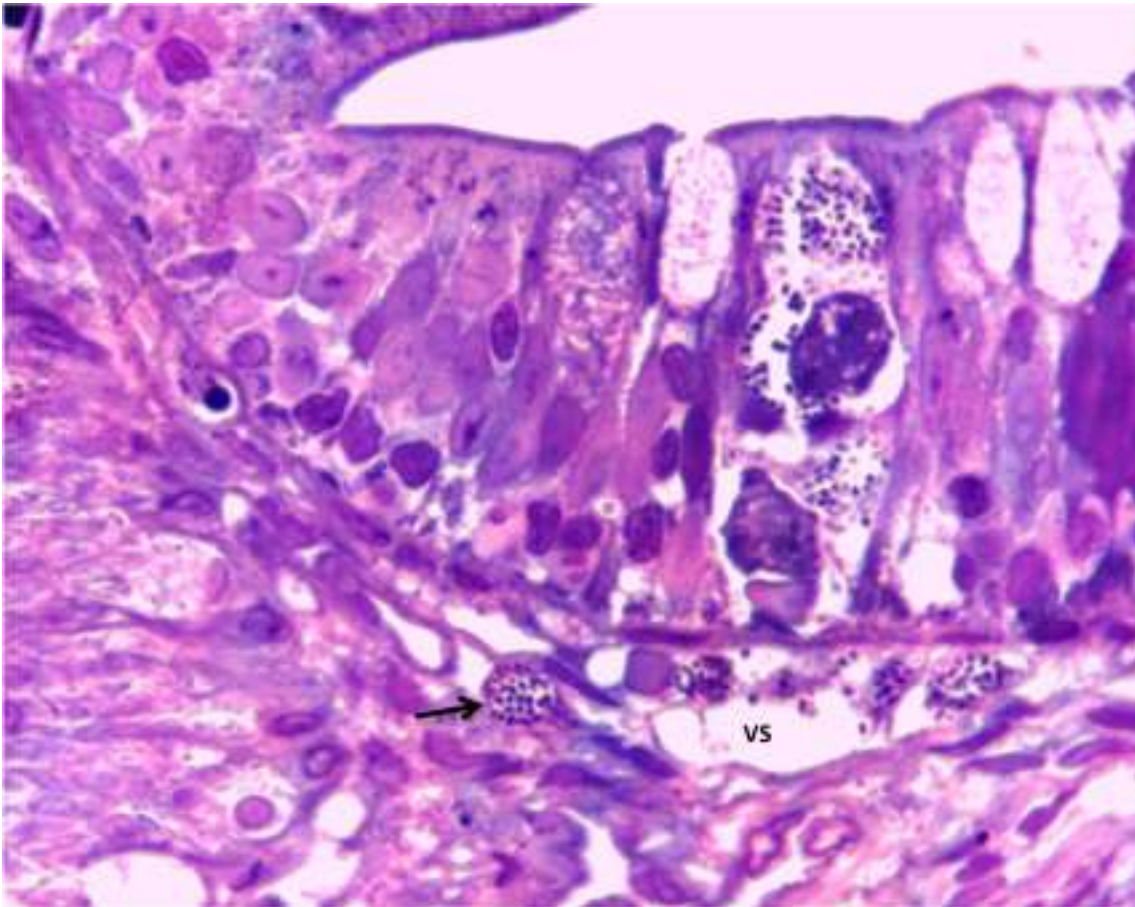


Grupo de dos estreptococos posicionados sobre una microvellosidad, la cual está doblada. Adicionalmente se observa la pérdida extensa y severa de microvellosidades y las pocas que quedan sobre el enterocito están dobladas y algunas desprendiéndose. MET, 22000X.

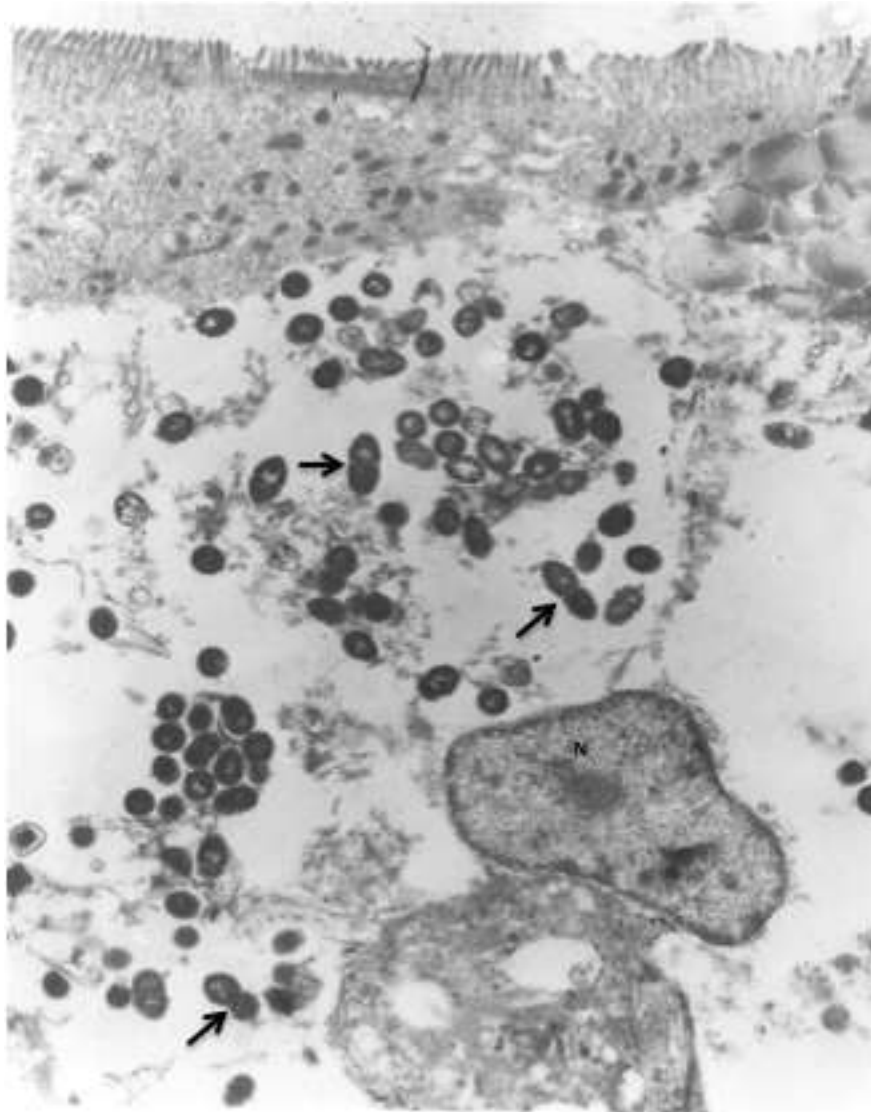
La principal ruta de ingreso de *S. agalactiae* a la lámina propia del intestino de la tilapia se lleva a cabo por vía transcelular, es decir por invasión a las células epiteliales y parece que no tiene lugar de forma individual sino en grandes grupos (Figura 2-13A y B). La interiorización del patógeno ocurre muy rápido y difícilmente se apreciaron individuos atravesando la membrana apical de los enterocitos. En el interior de los enterocitos las bacterias desprovistas de cápsula continúan dividiéndose alcanzando gran número, lo

que en ocasiones produce la muerte de la célula del hospedero; pero en general, la muerte de enterocitos no es muy alta. Posteriormente alcanzan la lámina propia y la túnica submucosa (Figura 2-14), donde acceden a los vasos sanguíneos desde donde se distribuyen sistémicamente. Es de resaltar de que a pesar de la abundante cantidad de microorganismos que ingresan, invaden los enterocitos y acceden a la lámina propia, la presencia de linfocitos siempre fue escasa, solo se demuestra la intervención de células de defensa, macrófagos, una vez los patógenos llegan a la lámina propia.

Figura 2-13: múltiples estreptococos en el citoplasma de dos enterocitos. Corte semidelgado (A) y MET (B).

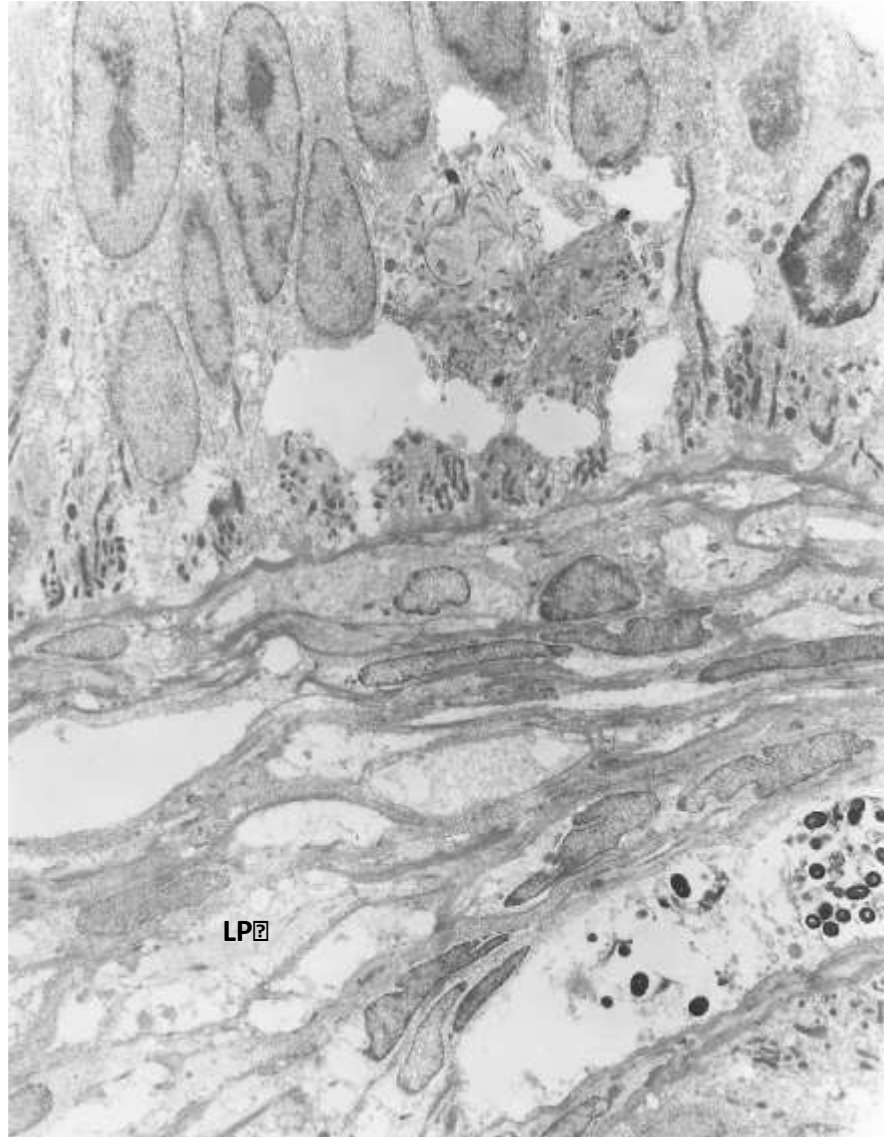


A. Corte semigalado de intestino de tilapia inoculado con *S. agalactiae* (SaTiBe08-18). Múltiples cocos en el citoplasma de dos enterocitos. Algunas bacterias ya han alcanzado la lámina propia y varias han ingresado a la luz de un vaso (VS); otros parecen estar limitados al interior de un macrófago (flecha) 1000X.



B. Enterocito conteniendo múltiples cocos libres en el citoplasma, varios de ellos en división (flechas). También se destaca que las bacterias no tienen cápsula. Nótese que a pesar del gran daño citoplasmático, el núcleo (N) parece no tener signos de muerte, MET 3000X.

Figura 2-14: Microfotografía electrónica de transmisión (MET) en la cual se observan múltiples cocos que han atravesado el epitelio y han alcanzado la lámina propia (LP).

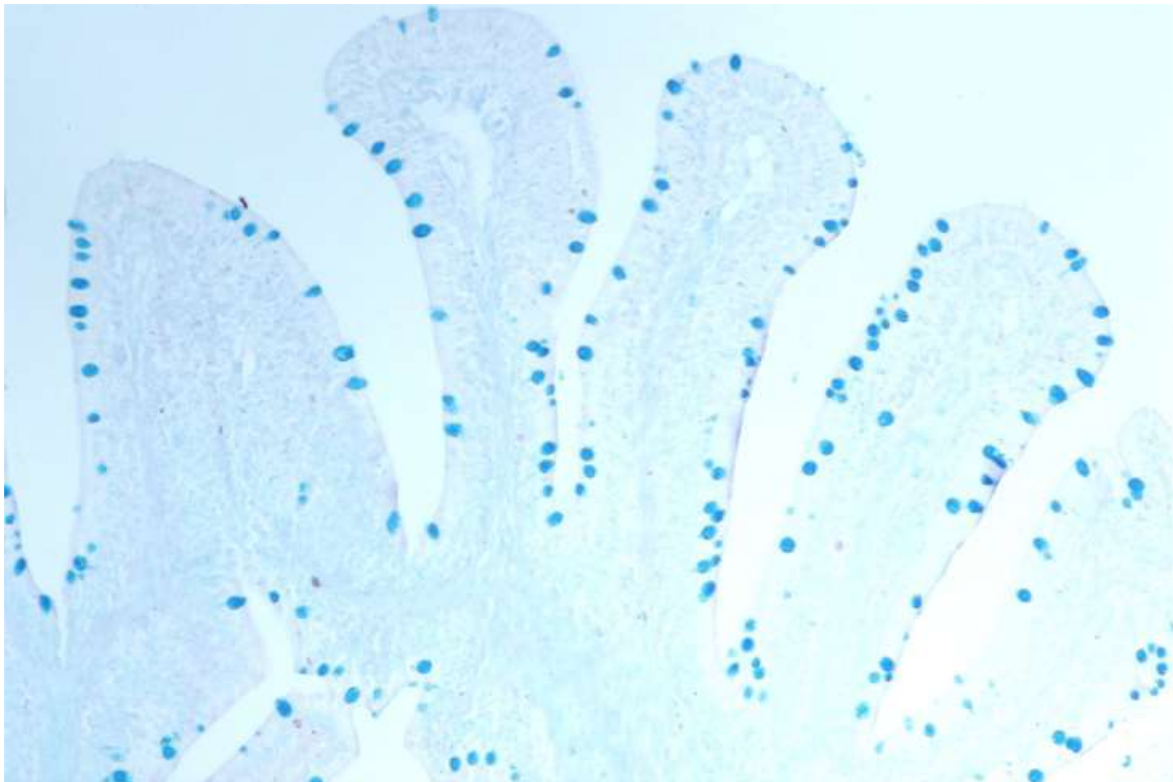


2.3.4 Coloración de Alcian blue y Pas

Con el objeto de conocer el papel de las células de moco del epitelio intestinal de la tilapia durante la infección por *S. agalactiae*, se llevó a cabo un conteo y caracterización histoquímica de estas células. No hubo diferencias significativas en la cantidad de células caliciformes entre los 3 tiempos de incubación (20, 30 y 40min) y las 3 dosis de concentración bacteriana utilizadas (10^7 , 10^8 y 10^9 UFCml⁻¹) vs el control (sin bacteria).

Adicionalmente la tinción con PAS para evaluar la producción de mucinas ácidas y neutras no presentó ninguna diferencia entre los explantes inoculados con la bacteria y el control (sin bacteria). La tinción de células caliciformes en todos los explantes evaluados fue de color azul, lo que nos indica que las mucinas en todos los explantes fueron neutras (Figura 2-15).

Figura 2-15: Intestino inoculado con *S. agalactiae* para evaluar la respuesta de las células caliciformes y caracterizar el tipo de mucinas secretadas. La coloración azul de las células caliciformes indica que las mucinas que se están produciendo son neutras. PAS/Alcian Blue.



2.4 Discusión

Estreptococosis en tilapia en Colombia es causada por *S. agalactiae* y probablemente es la enfermedad más importante para la producción de tilapia en todo el mundo (Pereira et al., 2010; Iregui et al., 2016). La prevención de la infección y la enfermedad por este

patógeno es necesaria y debe ser abordada no sólo por razones económicas, sociales, de comercio internacional, sino también de salud pública.

Son pocos los estudios y reportes de caracterización morfológica de las etapas iniciales de la infección y de la interacción del patógeno con el hospedero en el tracto gastrointestinal (GI) (Iregui et al., 2016), que nos permitan dilucidar cada uno de los eventos desde que la bacteria ingresa vía oral al hospedero hasta que atraviesa la mucosa GI, con el fin de desarrollar métodos de prevención de la infección y control de la enfermedad, sobre la base de principios ecológicos (Iregui et al., 2013; Iregui et al., 2016). Una primera aproximación a comprender esas interacciones iniciales entre *S. agalactiae* y el hospedero, llevó a demostrar que la principal, y tal vez la única vía de ingreso del microorganismo a los peces es la oral y desde allí a través de la invasión del epitelio GI utiliza su capacidad de invadir sistémicamente el resto del organismo de las tilapias. Como complemento al estudio de esta actividad adhesiva e invasiva de *S. agalactiae*, se propuso conocer cuál era la respuesta integrada de la mucosa intestinal una vez el patógeno hace contacto con el epitelio, que es el objetivo principal de este trabajo. Para ello se estableció en primer lugar un modelo experimental de cultivo *in vitro* de intestino de tilapia, mediante el cual se demostró que el *S. agalactiae* se despoja de la cápsula para adherirse al epitelio; se adhiere en grupos, cadenas o bacterias solitarias que se pueden dividir sobre el borde apical de los enterocitos; Se adhiere e invade casi exclusivamente por la porción apical de los pliegues; atraviesa la mucosa utilizando la ruta transcelular. Una vez en el citoplasma de los enterocitos las bacterias continúan dividiéndose. Atraviesan el epitelio hasta llegar a la lámina propia y acceden a la circulación. Durante todo el proceso de adherencia e invasión no se evidenció una respuesta inflamatoria de linfocitos en el epitelio. Hubo una producción de mucinas neutras durante la infección.

Puesto que el objetivo central de esta investigación era detallar los primeros momentos de la interacción entre *S. agalactiae* y la mucosa intestinal, fenómeno que se lleva a cabo en pocos minutos (Iregui et al., 2016; Barato et al., 2016), se decidió establecer como tiempo máximo de mantenimiento de los cultivos del órgano 2 h; sin embargo, de ser necesario este lapso se puede prolongar. Durante este tiempo el intestino mantiene sus características histológicas tal como las conocemos *in vivo*, como homogeneidad en la

longitud y ancho de los pliegues; homogeneidad en el tono de tinción de los pliegues por H&E; refringencia del borde en cepillo; integridad del epitelio y en particular de las células de moco, arquitectura y tinción de la lámina propia, etc. Son varias las ventajas que caben destacar de este modelo: se mantiene la tridimensionalidad del tejido, semejando las condiciones naturales; entendemos que las respuestas de la mucosa y eventualmente de toda la estructura del órgano frente a un patógeno, tienen un carácter integral, es decir, son el producto de la interacción de varios grupos celulares y no de una sola en particular; es un modelo sencillo de elaborar, las condiciones son controladas, poco consumo de tiempo, aproximadamente 4 horas para un ensayo de infección completo, etc. No de menor importancia, es el poco número de peces que se requieren para los experimentos, se pueden obtener 7 porciones de intestino anterior o sea 7 unidades experimentales por pez.

Tal vez una de las principales aproximaciones a la caracterización morfológica y de la patogénesis temprana de la infección por *S. agalactiae* en humanos la llevaron a cabo Valentin-Weigand et al. (1997), quienes utilizaron cultivos de células epiteliales HEP-2 y microscopía electrónica de transmisión; por medio de estos caracterizaron algunos de los eventos durante la adherencia e invasión de la bacteria. Ellos demostraron que las bacterias eran fagocitadas por las células y luego se encontraban dentro de vacuolas en el citoplasma. Otras aproximaciones morfológicas importantes de las etapas iniciales de adherencia e invasión han sido realizadas por (Soriano et al., 2006; Konto-Ghiorgi et al., 2009).

En este estudio se corroboran algunos de los hallazgos descritos en trabajos previos del grupo de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, entre ellos se confirma la pérdida total de la cápsula del *S. agalactiae* en su contacto con la superficie apical de los enterocitos; recientes resultados de nuestro grupo demuestran de manera experimental la mayor capacidad de adherencia de una mutante acapsulada del patógeno a la superficie apical de los enterocitos de tilapia frente a la cepa salvaje (Barato et al., 2016). Se confirma en adición la tendencia de *S. agalactiae* a formar grupos numerosos de individuos antes y durante la adherencia, así como durante la invasión a los enterocitos; estas agrupaciones de bacterias sobre la porción apical de los pliegues nos hacen sospechar de la formación de biofilm. La mayoría de estudios sobre

la capacidad de *S. agalactiae* para formar biofilm se han realizado en ensayos *in vitro* o macroscópicamente para evaluar la capacidad de la bacteria de formar biofilm sobre dispositivos de uso médico, pero no *in vivo* (O'Toole et al., 2000; Donlan and Costerton, 2002; Rinaudo et al., 2010; Rosini and Immaculada, 2015). Existe gran contradicción sobre la influencia del medio ambiente en la formación de biofilm, pero estudios recientes muestran evidencia de la importancia de las condiciones medioambientales como pH bajo y presencia de nutrientes como glucosa para estimular la producción de biofilm (Konto-Ghiorghi et al. 2009; Ho et al., 2013; D'Urzo et al., 2014). Estos reportes concuerdan con las condiciones dadas a nuestra bacteria en los experimentos (prelavado con SSF pH 5 y medio de cultivo enriquecido con glucosa), lo que nos lleva a pensar que las agrupaciones de bacterias sobre el ápice de los pliegues corresponden a biofilm. Igualmente se constató la enorme y constante capacidad de multiplicación de la bacteria, tanto que se divide no solo en el lumen del intestino, sino que durante su adhesión e invasión al epitelio continua dividiéndose incesantemente (Valentin-Weigand et al., 1997; Stoner et al., 2015; Iregui et al., 2016) de tal suerte que desde los primeros momentos de la infección el hospedero debe enfrentarse a grandes grupos de microorganismos; en nuestra opinión se trata este de uno de los principales mecanismos de virulencia del patógeno.

Con todo, esta investigación aporta nuevos elementos sobre el proceso de adhesión del microorganismo a la superficie epitelial. En primer lugar, una vez *S. agalactiae* se deshace de la cápsula desde su superficie emergen una serie de estructuras filiformes de algo menos de 200nm a manera de manojos que se proyectan hacia las microvellosidades de las células epiteliales a las cuales finalmente se unen (Fig. 11a); ¿se trata de pilis o de otros dispositivos adherentes?; la posibilidad de que se trate de pilis parece descartada por el momento, pues estudios recientes de nuestro grupo y de otro mostraron que *S. agalactiae* aislado de Colombia, el cual por lo demás pertenece a un solo clon (CC 552, ST260), no expresa varios de los factores de virulencia, particularmente estructuras de adhesión reportados principalmente para cepas de origen humano, tampoco se describen secuencias para adhesinas como elementos genéticos móviles ni pili, pues los genes que codifican para éstos se encuentran como pseudogenes o genes parcialmente presentes debido a la presencia de codones de stop (Barato et al., 2015; Barato et al., 2016; Delannoy et al., 2013; Delannoy et al., 2016). De no tratarse de

pilis las citadas proyecciones corresponderían en consecuencia a otra clase de adhesinas posiblemente azúcares u otras proteínas de adhesión. De todas formas es conveniente mencionar que en el caso de *Streptococcus agalactiae* que afectan a humanos, tienen la capacidad de eliminar o hacer delección parcial o completa de genes, muchos de los cuales codifican para factores de virulencia, dependiendo de las condiciones ambientales en que se encuentra el patógeno (Santi et al., 2009), de tal forma que cuando la bacteria se encuentra en medios adversos regenera, activa y expresa dichos genes para sobrevivir, protegerse, invadir y colonizar, pero cuando las condiciones le son favorables, no se hace necesaria la expresión de ciertos genes de virulencia y de supervivencia, por lo tanto el microorganismo los elimina total o parcialmente de su genoma. Sobre esta base nos atrevemos a no descartar completamente la ausencia total de pili en *S. agalactiae* de las tilapias de nuestro medio, puesto que la bacteria utilizada en este estudio además de haber sido lavada con SSF pH 5 para semejar el pH gástrico, fue expuesta a los cultivos de intestino, su hábitat “natural” al cual debe adherirse si quiere sobrevivir; es posible que el MEM no sea un medio suficiente para sus necesidades. Por el contrario, la cepa analizada por Barato et al, (2015) y Delannoy et al, (2013) y (2016) a pesar de ser la misma de los experimentos de este trabajo, es una bacteria que fue mantenida en medios de cultivo con todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y supervivencia, tampoco fue sometida a condición adversa o estrés alguno que la indujera a regenerar, activar y expresar dichos genes, factores de virulencia y mecanismos de defensa. Ahora bien, en otras ocasiones (Fig. 11b) además de los citados hilos antes discutidos, también de la pared del microorganismo parecen originarse otras estructuras en forma de cuarto manguante desde las cuales se proyectan hilos como los antes descritos que igualmente se unen a varias microvellosidades, sin embargo, estas microvellosidades además de separarse considerablemente del conjunto mayor de ellas, demuestran menor electrodensidad. Esto nos lleva a preguntarnos ¿se trata de desprendimiento de las mismas como un mecanismo de defensa de los enterocitos? a manera de una réplica en menor tamaño del desprendimiento de porciones mayores de los pliegues. Efectivamente, en esta investigación se encontró que cuando los grupos de cocos se localizan sobre el ápice de los pliegues se forman unos estrechamientos o estrangulamientos (Fig. 12 a y b) desde donde se desprenden algunas porciones de epitelio con las bacterias adheridas.

La adherencia de *S. agalactiae* como se demuestra en este estudio, tiene lugar casi exclusivamente en el extremo apical de los pliegues intestinales, es decir en la región de mayor absorción de los nutrientes, fue más escasa en las áreas laterales de los mismos, pero no se observó en áreas profundas, similar a lo reportado por Arbuckle, (1970) quien reportó la adherencia de *Escherichia coli* sobre las puntas de las vellosidades y no en las criptas intestinales de cerdos infectados naturalmente, dando explicación a este hallazgo por el hecho de que las puntas de las vellosidades tienen una mayor exposición al patógeno que las criptas. Adicionalmente otro factor que podría explicar la adherencia de algunos patógenos a la punta de los pliegues y no en las áreas profundas de las criptas, es la presencia de las células de Paneth en dichas zonas, las cuales secretan péptidos antimicrobianos (Ribet and Cossart, 2015).

Según se confirma en este trabajo, la principal forma de ingreso de *S. agalactiae* al epitelio intestinal se lleva a cabo por la vía transcelular, es decir, por invasión a las células epiteliales, conforme al reporte de Valentin-Weigan et al, (1997), quienes observaron la invasión transcelular del *S. agalactiae* en cultivos de células epiteliales HE-p2 (*Human Epidermoid carcinoma strain 2*); y como se señaló anteriormente, no lo hace de forma individual sino en grandes grupos. No se observó en ningún experimento que el microorganismo atravesara la barrera epitelial por la vía paracelular, es decir, entre dos enterocitos como lo reportado por Soriano et al, (2006) en cultivo monocapa de células de epitelio cervical (ME 180), inoculadas con *S. agalactiae*. Una vez en el interior de los enterocitos las bacterias desprovistas de cápsula continúan dividiéndose de manera rápida y abundante alcanzando gran número, lo que en ocasiones produce la muerte de la célula del hospedero, aunque en general la muerte de enterocitos no fue muy alta. Es de resaltar en esta investigación que las lesiones y respuesta inflamatoria en el intestino de tilapia frente a la invasión por *S. agalactiae* es escasa y en ocasiones nula; esta observación confirmaría parcialmente los hallazgos de nuestro grupo y de otros en el sentido de que este órgano no es uno de los que más frecuentemente muestran lesiones propias de la infección (Iregui et al., 2016). Por ejemplo, la muerte de los enterocitos, principal y hasta ahora única ruta de ingreso de la bacteria, es un evento esporádico por no hablar de anecdótico, a pesar de la elevada cantidad de bacterias multiplicándose en su citoplasma. Pero aún más sorprendente fue la prácticamente inexistente respuesta de las células caliciformes, toda vez que ellas como un componente inmediato de la respuesta

innata son unas de las primeras en reaccionar a la presencia de diferentes agentes extraños. Pero tampoco la respuesta adquirida (el número de linfocitos intraepiteliales) mostró cambio llamativo alguno. De todo lo anterior solo se pueden adelantar algunas conjeturas. La primera es que definitivamente el patógeno está tan bien adaptado molecularmente a su hospedero que pasa casi desapercibido; otra explicación puede ser inmunotolerancia a patógenos que ingresan por ruta oral, como lo reportado por Chistiakov et al, (2015). Quizá la principal explicación a este hallazgo radica en la presencia de ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) sobre la superficie del *S. agalactiae*. Este ácido es idéntico al ácido siálico que se encuentra sobre las células del hospedero lo que le permite al patógeno engañar al sistema inmune. Adicionalmente Neu5Ac se une a una familia de proteínas tipo lectinas (SIGLEC) expresadas sobre las células fagocíticas y células presentadoras de antígenos. La mayoría de SIGLEC a las que se unen envían señales inhibitorias de la respuesta inflamatoria (Carlin et al., 2007; Chang et al., 2014). Este hallazgo en términos prácticos explicaría la constante frustración que en la industria piscícola ha significado el desarrollo de vacunas orales contra distintos tipos de patógenos. Como contraparte y en apoyo de las hipótesis y resultados de nuestro grupo, se confirmaría que la forma más eficaz de detener el ingreso de diversos patógenos a los peces es impidiendo su adherencia a las superficies mucosas, para este caso, al epitelio gastrointestinal.

2.5 Conclusiones y Recomendaciones

2.5.1 Conclusiones

La presente investigación estandarizó un cultivo de intestino de tilapia *in vitro* el cual se mantuvo viable hasta 2 horas y nos permitió detallar la respuesta integrada de la mucosa intestinal una vez el patógeno hace contacto con el epitelio. Adicionalmente logramos confirmar como principal vía de ingreso e infección la ruta gastrointestinal y que el *S. agalactiae* se despoja de la cápsula para adherirse al epitelio; logramos demostrar que el *Streptococcus agalactiae* que afecta a las tilapias en Colombia se adhiere en grupos, cadenas o bacterias solitarias que se pueden dividir sobre el borde apical de los enterocitos; se adhiere e invade casi exclusivamente por la porción apical de los pliegues; atraviesa la mucosa utilizando la ruta transcelular. Una vez en el citoplasma de los enterocitos las bacterias continúan dividiéndose. Atraviesan el epitelio hasta llegar a

la lámina propia. Durante todo el proceso de adherencia e invasión no se evidenció una respuesta inflamatoria de linfocitos ni respuesta de las células caliciformes en el epitelio. Esta investigación aporta herramientas a la escuela de conocimiento en enfermedades infecciosas del grupo de Patobiología Veterinaria de la FMVZ de la UNAL y otros grupos de investigación interesados en la sanidad piscícola y la búsqueda de posibles medidas de control del *S. agalactiae* que afecta la producción de tilapia en Colombia y el mundo.

2.5.2 Recomendaciones

Con los resultados obtenidos en esta investigación y otros de los resultados obtenidos por el Grupo de Patobiología Veterinaria vemos la necesidad de que las futuras investigaciones y medidas para el control y erradicación de esta enfermedad en tilapias tanto en Colombia como en otros países no se enfoquen únicamente en la elaboración de vacunas y utilización de antibióticos, los cuales hasta el momento no han demostrado ser una solución eficaz a este problema. Nuestros resultados muestran que las estrategias para minimizar el impacto de esta enfermedad deben enfocarse principalmente en medidas ecológicamente viables que eviten la adhesión de la bacteria a las superficies epiteliales a las cuales se adhiere.

2.6 Referencias

- Agnew, W., & Barnes, A. C. (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary microbiology*, 122(1), 1-15.
- Arbuckle, J.B.R. (1970). The location of *Escherichia coli* in the pig intestine. *Journal medical Microbiology* 3, 333.
- Barato, P., Martins, E.R., Melo-Cristino, J., Iregui, C.A., and Ramirez, M. (2015). Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in Colombia over 8 years. *Journal of Fish Diseases*, 38, 1083–1087.
- Barato, P., Martins, E. R., Vasquez, G. M., Ramirez, M., Melo-Cristino, J., Martínez, N., & Iregui, C. (2016). Capsule impairs efficient adherence of *Streptococcus agalactiae* to intestinal epithelium in tilapias *Oreochromis* sp. *Microbial Pathogenesis*, 100, 30-36.
- Carlin, A. F., Lewis, A. L., Varki, A. & Nizet, V. (2007). Group B streptococcal capsular

- sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *Journal of Bacteriology* 189, 1231–1237.
- Chang, Y. C., Olson, J., Beasley, F. C., Tung, C., Zhang, J., Crocker, P. R., ... & Nizet, V. (2014). Group B Streptococcus engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses in vivo. *PLoS Pathog*, 10(1).
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Kozarov, E., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2015). Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Frontiers in microbiology*, 5, 781.
- Delannoy, C.M., Crumlish, M., Fontaine., M.C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M. P., Zadoks, R.N. (2013). Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC microbiology* 13(1), 1.
- Delannoy, C. M. J., Zadoks, R. N., Crumlish, M., Rodgers, D., Lainson, F. A., Ferguson, H. W., ... & Fontaine, M. C. (2016). Genomic comparison of virulent and non- virulent *Streptococcus agalactiae* in fish. *Journal of fish diseases*,39(1), 13-29.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- D'Urzo N., Martinelli M., Pezzicoli A., De Cesare V., Pinto V., Margarit I., et al. (2014). Acidic pH strongly enhances *in vitro* biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae* strains. *Applied Environmental Microbiology* 80, 2176–2185.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H., & Al-Ablani, S. (2006). First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 42(3), 561-569.
- Gibson-Corley K. N., Olivier A. K. and Meyerholz D. K. (2013). Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary Pathology* 50, 1007-1015.
- Ho, Y.R., Li, C.M., Yu, C.H., Lin, Y.J., Wu, C.M., Harn, I.C., et al. (2013). The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. *Medical Microbiology and Immunology* 202, 105–115.
- Iregui, C., Barato, P., Rey, A., Vasquez, G., and Verjan, N. (2013). Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and Streptococcosis in Tilapia Fish.
- Iregui, C., Comas, J., Vásquez, G., & Verján, N. (2016). Experimental early pathogenesis

- of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of fish diseases*, 39(2), 205-215.
- Konto-Ghiorghi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., & Dramsi, S. (2009). Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog*, 5(5).
- Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Domínguez, L. and Fernández-Garayzabal, J.F. 2004b. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 3183-3187.
- Mian, G., Godoy, D., Leal, C., Yuhara, T., Costa, G., and Figueiredo, H. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 136(1), 180-183.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Parsons, K., Wilson, A., Hall, G., Bridger, J., Chanter, N., & Reynolds, D. (1984). Localisation of enteropathogens in paraffin embedded tissue by immunoperoxidase. *Journal of clinical pathology*, 37(6), 645-650.
- Pereira, U., Mian, G., Oliveira, I., Benchetrit, L., Costa, G., & Figueiredo, H. (2010). Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 140(1), 186-192.
- Pujol, C., Eugene, E., de Saint, Martin., Nassif X (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells. *Infect Immun* 65: 4836–4842.
- Pulido, A., Figueroa, J., and Castro, C.A. (1999). Reporte de streptococcosis en tilapias cultivadas en Colombia.
- Rey, A., Castro, C. I., & Verján, N. (2003). Diagnóstico clínico patológico de brotes de enfermedades en tilapia roja (*Oreochromis* spp.). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 49(1), 13-21.
- Ribet, D., & Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, 17(3), 173-183.
- Rinaudo, C. D., Rosini, R., Galeotti, C. L., Berti, F., Necchi, F., Reguzzi, V., and Maione, D. (2010). Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B

- Streptococcus. *PLoS One*, 5(2), e9216.
- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T. M., & Olsen, R. E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268(1), 251-264.
- Rosini, R., & Margarit, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front. Cell Infect. Microbiol*, 5(6).
- Santi I., Maione D., Galeotti C.L., Grandi G., Telford J.L., Soriani M. 2009. BibA induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B *Streptococcus*. *Journal of Infectious Disease* 200:564–570.
- Soriano, M., Santi, I., Taddei, A., Rappuoli, R., Grandi, G., & Telford, J. L. (2006). Group B *Streptococcus* crosses human epithelial cells by a paracellular route. *Journal of Infectious Diseases*, 193(2), 241-250.
- Stoner, T. D., Weston, T. A., Trejo, J., & Doran, K. S. (2015). Group B Streptococcal Infection and Activation of Human Astrocytes. *PloS one*, 10(6), e0128431.
- Valentin-Weigand, P., Jungnitz, H., Zock, A., Rohde, M., and Chhatwal, G. S. (1997). Characterization of group B streptococcal invasion in HEp-2 epithelial cells. *FEMS microbiology letters*, 147(1), 69-74.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology*

A. Anexo: Hipótesis planteadas en el modelo estadístico

Se hizo un análisis de chi cuadrado por evaluador, bacteria, dosis y tiempo para determinar la independencia de la presencia-ausencia de cada variable de rangos evaluada (adherencia, detritus y necrosis), para lo cual se propuso las siguientes hipótesis:

H₀: La presencia o ausencia de adherencia bacteriana a la mucosa intestinal de la tilapia, por cada evaluador, para cada bacteria (WT y Δ cps), es independiente de la dosis de incubación utilizada.

H₁: La presencia o ausencia de adherencia bacteriana a la mucosa intestinal de la tilapia, por cada evaluador, para cada bacteria (WT y Δ cps), es dependiente de la dosis de incubación utilizada.

H₀: La presencia o ausencia de adherencia bacteriana a la mucosa intestinal de la tilapia, por cada evaluador, para cada bacteria (WT y Δ cps), es independiente del tiempo de incubación utilizado.

H₁: La presencia o ausencia de adherencia bacteriana a la mucosa intestinal de la tilapia, por cada evaluador, para cada bacteria (WT y Δ cps), es dependiente del tiempo de incubación utilizado.

Este juego de hipótesis se probó para las otras dos variables (detritus y necrosis)

1. Para severidad de la presencia de la variable observada, el modelo fue completamente al azar por evaluador (dos evaluadores), con arreglo factorial $2 \times 4 \times 3$ (dos bacterias, cuatro dosis y tres tiempos) para las variables de rangos observadas (adherencia bacteriana, detritus y necrosis celular) de tal forma que se pudiera encontrar diferencias en las bacterias, las dosis y los tiempos y de esta forma determinar la mejor dosis de inoculación y el mejor tiempo de incubación para el establecimiento del modelo de infección *in vitro* que permita caracterizar la interacción hospedero patógeno en las etapas iniciales de la infección.

Este modelo estadístico tiene como supuestos: material experimental homogéneo y error experimental variable aleatorio independiente. Las hipótesis que resultaron significativas se analizaron con la prueba de Tukey.

Para todos los análisis se utilizó una confianza > 90%. El modelo permite probar las hipótesis de la interacción de primer y segundo orden y la de los efectos principales. A continuación, se presenta la de segundo orden:

H₀bacteria*dosis*tiempo: La bacteria, la dosis y el tiempo son independientes para el promedio de la severidad de la adherencia bacteriana al epitelio intestinal.

H₁bacteria*dosis*tiempo: La bacteria, la dosis y el tiempo son dependientes para el promedio de la severidad de la adherencia bacteriana al epitelio intestinal.

Este juego de hipótesis se probó para las otras dos variables (detritus y necrosis)

Para la prueba de chi cuadrado de la (presencia-ausencia) se encontró lo siguiente:

- Diferencias estadísticamente significativas en la adherencia al comparar dosis y bacteria ($P < 0.0001$)
- No hay diferencias estadísticamente significativas en la adherencia al comparar tiempo y bacteria
- Los otros parámetros no tienen diferencias estadísticamente significativas

Análisis de Varianza Tukey, correlación entre variables (bacteria, dosis, tiempo):

- Diferencias estadísticamente significativa en la adherencia al correlacionar bacteria*dosis*tiempo (C1 $P = 0.0322$ y C2 $P = 0.0195$).