

08 a 11 de Outubro de 2018
Instituto Federal Fluminense
Búzios - RJ

Desenvolvimento de Bactérias Artificiais Mutantes *Streptococcus agalactiae* híbridas entre *Oreochromis niloticus* e *Homo sapiens* por via de Algoritmos Genéticos e Meta-Heurísticas

Edgar Lacerda de Aguiar¹ - edgarlaguiar@gmail.com

Gustavo H. M. Mendonça¹ - gurumendonca@gmail.com

Cláudia B. Assunção² - assuncaoelb@gmail.com

Paulo M. Almeida¹ - pema@lsi.cefetmg.br

Sandro R. Dias¹ - sandro@decom.cefetmg.br

Thiago S. Rodrigues¹ - tsouza@decom.cefetmg.br

¹ Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, PPGMMC - Belo Horizonte, MG, Brasil

² Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte - Belo Horizonte, MG, Brasil

Resumo. *Os microrganismos podem ser classificados e observados em diferentes reinos biológicos, sendo amplamente distribuídos pela natureza, detectados nos lugares mais inóspitos, afetando diretamente o padrão ambiental e outros organismos. Neste trabalho serão geradas bactérias artificiais mutantes de *Streptococcus agalactiae* por meio de Algoritmos Genéticos e Meta-Heurísticas, seguida de análises pangenoma da espécie, combinando os clusters de genes das linhagens encontradas no peixe Tilápia (*Oreochromis sp.*) e com os de Humanos (*Homo sapiens*), sua posterior classificação em uma máquina de inferência Fuzzy com o modelo Mamdani. Visando auxiliar estudos genômicos entre os possíveis perfis das bactérias e desenvolver análises comparativas necessárias para auxiliar na criação de um novo perfil genômico híbrido de humano com os genes de peixe, de modo a se preparar para um eventual surto e como tratá-las de forma preventiva. A aplicação da Máquina Fuzzy se mostrou muito útil para auxiliar nas tomadas das decisões e nas classificações dos perfis das bactéria. Após execuções dos algoritmos foi possível gerar novos mutantes híbridos com perfil de humano e peixe factíveis, que obtiveram bons resultados para adaptabilidade e sobrevivência.*

Palavras-chave - Sistema Fuzzy, Organismos Artificiais, *Streptococcus agalactiae*, Inteligência Computacional

1. Introdução

Os microrganismos podem ser classificados e observados em diversos reinos biológicos, sendo amplamente distribuídos pela natureza. A alta diversidade de microrganismos contribui para uma grande quantidade de informações que impulsionam estudos em diversas áreas como:

agrícola, medicinal e industrial Tortora (2016). Tais microrganismos são encontrados nos lugares mais "hostis", afetando diretamente o padrão ambiental e outros organismos habitantes do mesmo. Levando-se em consideração essas informações, e ao extrapolar para o convívio humano, é possível apontar que tais características possam refletir em impactos significativos na economia, saúde e ambiente de forma positiva ou negativa Madigan (2016).

Dentre os microrganismos mais estudados estão as bactérias. Elas são de grande importância medicinal, biotecnológica, veterinária, ambiental, são os mais antigos organismos da Terra, com amostras localizadas em rochas de 3,8 milhões de anos Junior (1996).

As bactérias possuem inúmeros fatores os quais tornam-se excelentes modelos para diversos estudos genômicos como: conservação de funções celulares em comum com organismos mais complexos, a possibilidade de se obter rapidamente em meio de cultura adequado uma elevada quantidade de material biológico, e possui a vantagem de ter um custo de desenvolvimento significativamente menor quando comparado a organismos eucariotos Junior (1996), Madigan (2016). Dentre as diversas características das bactérias, uma das mais importantes é a reprodutividade, pois elas permitem a geração de mutações, transferências de genes entre espécies, trocas e ganhos de fatores de virulência e aquisição de novas resistências Madigan (2016). Os novos fatores de virulência e resistência aumentam significativamente o risco para os hospedeiros, pois a cada nova resistência adquirida, aumenta-se a necessidade de se desenvolver novos antibacterianos e bactericidas para combatê-los, sendo que a cada dia, antigos fármacos se tornam menos eficazes e, assim, aumentam o custo de pesquisas para se combater as novas resistências obtidas Quinn (2005).

Dentro do filo das *Firmicutes* encontra-se o gênero *Streptococcus*. Esse gênero atualmente tem 121 espécies, 23 subespécies identificadas e, aproximadamente, 100 mil artigos relacionados. Dentre as espécies mais estudadas, destaca-se a *Streptococcus agalactiae*, uma bactéria patogênica que afeta diversos hospedeiros Lpsn (2018).

Atualmente existem apenas por volta de 40 genomas completos de *S. agalactiae* depositados no banco de dados públicos, tornando-se necessário um aumento significativo no número de linhagens, pois esse valor baixo é um grande dificultador das análises comparativas Ncbi (2018).

Outros fatores complexos são: o custo elevado de sequenciamento com plataformas NGS (*Next-Generation Sequencing*) e a elevada dificuldade técnica da montagem de genoma completo. Por tais motivos é necessário desenvolvimento de novas abordagens *in silico* para simular novas linhagens.

Streptococcus agalactiae é uma bactéria de grande importância médica e veterinária, devido ao alto impacto econômico e social, associado ao elevado número de patogenicidade em diversos hospedeiros e à alta diversidade genética entre as linhagens. Atualmente, existem aproximadamente 900 genomas de *S. agalactiae* depositados no banco de dados público do NCBI, porém a grande maioria é incompleta, sendo apenas 40 genomas completos tornando-se necessário um aumento significativo no número de linhagens, pois esse valor baixo é um grande dificultador das análises comparativas Ncbi (2018).

Estudos com todos os sorotipos de GBS são de elevada importância para evitar crises epidemiológicas e auxiliar no desenvolvimento de drogas e vacinas mais eficazes. Outro fator importante é que a variação dos sorotipos ocorre de acordo com hospedeiro e com a região geográfica. Tais trabalhos podem auxiliar os futuros estudos comparativos entre os gêneros, espécies e linhagens Criação de novos mutantes híbridos podem colaborar para análises comparativas, aumentando robustez da análises, auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos, na criação ou melhoria de métodos de classificação das linhagens, ações essas que pode minimizar o impacto do GBS na sociedade.

Uma das formas de se realizar este estudo é por meio da utilização de inteligência computacional. Neste trabalho, foi implementado um algoritmo híbrido envolvendo meta-heurística, mais especificamente o *Simulated Annealing* (SA) e Algoritmo Genético (AG), de modo a criar computacionalmente bactérias mutantes (com genes de peixe tilápia e humano) para futuras análises Linden (2008) Kirkpatrick (1983).

Estas bactérias foram geradas procurando serem mais fieis a realidade possível considerando o perfil genômico da espécie e sua probabilidade de sobrevivência e sua capacidade adaptativa. Serão dados maiores pesos aos genes de peixes originários da Ásia e genes de Humanos da América, pois o maior objetivo é estudar e prevenir mutações de bactérias com características destes peixes e com capacidade de afetarem humanos no continente Americano.

Em seguida, será criada uma máquina de inferência *Fuzzy* onde as bactérias serão classificadas considerando as informações obtidas pelo algoritmo, e resultará em uma nota para cada bactéria referente à sua probabilidade de sobrevivência e sua capacidade de adaptação. De modo a avaliar a eficiência da máquina *Fuzzy*, as bactérias serão também avaliadas, considerando os mesmos aspectos, por duas especialistas uma de Biomedicina, e Microbiologia, auxiliando na comparações e nas análises dos resultados Almeida (2003).

2. Metodologia

A análise comparativa genômica consiste em comparar e selecionar quais os genes que são encontrados em determinadas linhagens do *Cluster* em uma determinada condição. Tais análises inicialmente iam ser realizadas pelos identificadores de genes, porém o mesmo gene é anotado com diferentes termos em diversas linhagens tal fato dificulta bastante uma análise comparativa por termos e ontologias. Foi necessário realizar alinhamento de sequencias locais entre os genes de cada linhagem do *Cluster*, os parâmetros foram de no mínimo 90% identidade e 90% de cobertura. Após obtenção das linhagens no formato textual GBFF (*Genbank Flat File*) no Site do NCBI, as linhagens foram separadas em diversos *Clusters* gênicos, sendo:

- 1º - *Cluster Homo sapiens*: análises *Core*, *Parcial* e *Unique*;
- 2º - *Cluster Homo sapiens América X Homo sapiens Ásia*: análises *Core*, *Parcial* e *Unique*;
- 3º - *Cluster Oreochromis sp*: análises *Core*, *Parcial* e *Unique*;
- 4º - *Cluster Oreochromis sp América X Oreochromis sp Ásia*: análises *Core*, *Parcial* e *Unique*;
- 5º - *Cluster Homo sapiens X Oreochromis sp*: análises *Core*, *Parcial* e *Unique*.

A análise comparativa de *Core* consiste em selecionar quais genes são encontradas em todas as linhagens do *Cluster*. Já a *Parcial* são todos os genes que existem em um determinado grupo e não existem no outro. No *Unique* são os genes que existem exclusividade em um sub grupo refinado de um determinado grupo. Para as análises comparativas de sequencias das linhagens de *Streptococcus agalactiae* foram gastos aproximadamente 13 a 15 dias para os maiores *clusters* e nos *clusters* menores de 7 a 9 dias, todas as análises foram realizadas num servidor robusto de alto desempenho (S.O. CentOS 6.4, Processador 64 bits com 64 cores, 1 TB de memória RAM e 30 TB de armazenamento em disco). As saídas das análises comparativas foram usadas para as próximas etapas do trabalho.

Os algoritmos de computação evolutiva trabalham com um repertório (população) de soluções candidatas que interagem entre si e competem pela permanência na população. A evolução

é alcançada basicamente pelos processos de reprodução dos indivíduos com herança genética, variação em uma população de indivíduos (mutação, que ajuda a criar diversidade na população) e aplicação da "seleção natural" para produção da próxima geração, onde indivíduos mais bem adaptados tem maiores chances de sobreviverem Linden (2008). Segundo Goldberg e Holland(1988), um algoritmo genético (AG) é uma técnica de busca que localiza uma sequência ótima, através do processamento de uma população de sequências inicializadas aleatoriamente, usando técnicas inspiradas na biologia evolutiva, como hereditariedade, mutação, seleção natural e recombinação (*Crossover*) Goldberg (1988).

O AG foi implementado na linguagem Java, na IDE NetBeans. As informações referentes ao genes foram obtidas da base de dados já citada e nas etapas anteriores. Todos os genes do Core Genoma foram definidos com peso 1 (sendo maior o peso quanto mais influente no estudo), os genes do *Parcial Core* foram definidos com peso 2, aos genes *exclusive* de peixe América foi dado peso 1,5.

Já para genes *exclusive* de peixe da Ásia foi dado peso 3, pois são genes que tem maior importância para este trabalho, uma vez que os peixes da Ásia afetando humanos da América seriam o caso mais grave devido às diferentes possibilidades de mutações e o atual despreparo para esta situação hipotética. Pelo mesmo motivo, os genes *exclusive* de humano da América possuem peso 3. Finalmente, os genes *exclusive* de humano da Ásia foi dado peso 2.

Para uma bactéria ser factível, (e mais fiel a uma possível bactéria real), foi considerado que a mesma deve ter tamanho entre 2000kb e 2400kb, deve possuir todo o *core* genoma do hospedeiro (humano), deve possuir entre 40% e 60% do *Parcial Core* (peixe) e deve possuir entre 40% e 70% do *Unique Core*.

Para a seleção foi utilizada a Roleta Simples e Ranqueamento. O número de pareamentos para o cruzamento foi definido como a metade do número de indivíduos da população. Se a população possui 100 bactérias, ocorrerão 50 pareamentos, por exemplo. O *Crossover* foi implementado considerando os genes *Parcial* e *Unique* das bactérias, uma vez que o core genoma do hospedeiro deve estar totalmente presente na bactéria (sendo inclusive critério de factibilidade), não fazendo sentido utilizar *Crossover* neste grupo de genes. O *Crossover* é feito com 1 ponto de corte definido aleatoriamente para o *Parcial Core* e outro para o *Unique core* da bactéria, podendo ser pontos diferentes. Os parâmetros utilizados nas execuções foram os seguintes:

- Tamanho da População: 250;
- Número de Gerações: 400;
- Taxa de Mutação: 0,3;
- Taxa de Cruzamento: 0,8;
- Critério de parada: Número de gerações atingido;

O algoritmo *Simulated Annealing* parte da analogia entre o comportamento dos problemas de otimização combinatória e os grandes sistemas físicos estudados em mecânica estatística. Foi mostrado que o modelo da mecânica estatística para simular processos de *Annealing* (recozimento, geralmente em metais), proposto por Metropoles et al.(1953), podia ser estendido para resolver problemas de otimização em geral, especialmente otimização combinatória Metropoles (1953). Na prática o algoritmo funciona tendo uma solução inicial (que pode ser gerada aleatoriamente ou não) e à partir desta solução inicial, soluções vizinhas vão sendo criadas e

comparadas com a melhor solução atual, substituindo-a quando for melhor. Uma "solução vizinha" é parecida com a solução de origem, com alguma pequena modificação em sua estrutura. Este processo de gerar uma solução vizinha e verificar se a mesma passa a ser a atual (estado corrente) é repetido N vezes (sendo N o número de iterações a cada temperatura), e após este processo, a temperatura é diminuída. O procedimento se repete até que um critério de parada seja alcançado, normalmente sendo a temperatura alcançar um valor abaixo de um mínimo desejado Kirkpatrick (1983).

O SA, a exemplo do AG, também foi implementado em Java e utilizando a IDE NetBeans. A bactéria resultante do AG (melhor bactéria encontrada ao final da execução) foi utilizada como parâmetro inicial do SA. Os seguintes parâmetros foram utilizados nas execuções:

- $\alpha = 0.999$; (valor que determina o decaimento da temperatura);
- Número de iterações = 200;
- Temperatura Inicial = 1000

Na lógica *Fuzzy* a ambiguidade semântica da inteligência humana pode ser representada por meio de variáveis linguísticas e seus termos primários. Uma variável linguística é uma entidade utilizada para se representar de modo impreciso e, portanto, linguístico, um conceito ou variável de um dado problema. Ela admite como valores as expressões linguísticas (chamadas de termos primários), em contraste com uma variável numérica que assume apenas valores precisos. Os termos primários de uma variável linguística formam a sua estrutura de conhecimento. Por exemplo, a variável linguística "Altura" poderia admitir os termos primários "Muito alto", "razoavelmente baixo", etc Almeida (2003). A propriedade sintática adotada nos modelos *Fuzzy* de Mamdani define regras de produção que possuem relações *Fuzzy* tanto em seus antecedentes quanto em seus consequentes. Neste modelo, o módulo de interface (entrada) recebe valores numéricos e os converte em conjuntos *Fuzzy* equivalentes, sendo uma conversão escalar para *Fuzzy*. A máquina de inferência então busca em seu banco de conhecimento e processa as regras disparadas pela entrada, fazendo uma composição das mesmas. Então, o módulo de interface de saída recebe um conjunto *Fuzzy* (processado anteriormente) para cada variável de saída e o converte em um valor escalar correspondente, gerando saídas compatíveis com os sistemas externos, chamado de conversão *Fuzzy* \rightarrow *escalar* Almeida (2003).

Nas máquinas de inferência *Fuzzy* as bactérias resultantes das execuções do algoritmo completo (AG+SA) foram classificadas em uma máquina *Fuzzy* de Mamdani. Este sistema possui três variáveis linguísticas de entrada e duas de saída. As variáveis linguísticas de entrada são o tamanho da bactéria, sua pontuação (valor) de *Parcial Core* e sua pontuação (valor) de *Unique Core*. A entrada "tamanho" admite os termos primários pequeno, ideal e grande. Os três termos foram representados por funções triangulares, sendo que o termo ideal abrange de 1800kb a 2600kb, possuindo pertinência 1 em 2200 kb. As variáveis de entrada *Score Parcial* e *Score Unique* admitem os termos primários baixo, médio e alto, todas sendo representadas por funções triangulares. Para estas variáveis, quanto maior seu valor, melhor a bactéria. As variáveis de saída foram adaptabilidade e probabilidade de sobrevivência. Ambas admitem os termos primários muito baixa, baixa, média, alta e muito alta. Procuramos então a bactéria com a melhor adaptabilidade e melhor probabilidade de sobrevivência possível. Os termos muito baixa e muito alta foram representados por funções trapezoidais, enquanto os termos baixa, média e alta foram representados por funções triangulares. As partições *Fuzzy* de saída admitem valores entre 0 e 1, indicando qual bactéria que possui melhor valor de adaptabilidade e probabilidade de sobrevivência.

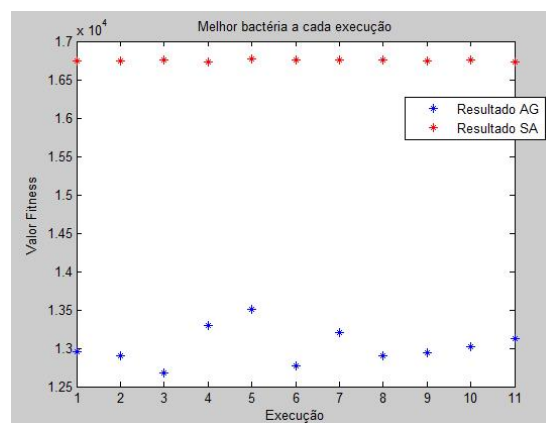
3. Resultados

A Tabela 1 apresenta os valores de *Fitness* das melhores bactérias resultantes do AG (que foram utilizadas como as bactérias iniciais no SA), e os valores das bactérias após a execução final do algoritmo, contemplando o SA. Conforme é possível observar na Figura 1, com a execução do Algoritmo SA após a execução do algoritmo genético houve uma melhoria significativa dos valores de *Fitness* das bactérias (entre 30% a 35%). Tal resultado justifica sua utilização e reforça a importância da combinação de abordagem múltiplas dos algoritmos para obtenção de melhores resultados. O algoritmo completo foi executado 11 vezes por dois motivos, primeiro pelo elevado consumo de memória, e segundo pelo longo tempo de execução, sendo a cada execução foi selecionada a melhor bactéria gerada. Em seguida as características de cada uma foram inseridas na máquina de inferência *Fuzzy*, criada no *Matlab*, e as bactérias foram classificadas considerando sua adaptabilidade e probabilidade de sobrevivência.

Tabela 1: Resultado das melhores bactérias

Execuções	Valor AG.	Valor SA.
1	12.955,3922	16.743,2627
2	12.903,8563	16.744,4494
3	12.673,0982	16.759,9242
4	13.301,1055	16.733,9944
5	13.511,7611	16.775,8029
6	12.766,9976	16.754,0821
7	13.201,3488	16.752,5942
8	12.895,3325	16.759,7305
9	12.934,6764	16.744,8231
10	13.021,4467	16.750,9534
11	13.123,1812	16.733,4750

Figura 1: Valores de *Fitness* das bactérias



Após a classificação das bactérias pela máquina *Fuzzy*, as especialistas Microbiologia e Biomedicina classificaram as bactérias de acordo com sua adaptabilidade e probabilidade de sobrevivência. Os resultados da classificação pela máquina *Fuzzy* e pelo especialistas podem ser vistos na Tabela 2, onde é mostrado para cada uma das onze execuções o tamanho da bactéria, sua pontuação do *Partial Core*, pontuação do *Unique Core*, classificação (de zero a um) referente à adaptabilidade da bactéria pela máquina *Fuzzy*, classificação (de zero a um) referente à adaptabilidade da bactéria pela máquina *Fuzzy*. Além da classificação quanto adaptabilidade e sobrevivência pelas especialistas. Os resultados mostram que as bactérias geradas pelo algoritmo possuem bons atributos tanto em adaptabilidade quanto em probabilidade de sobrevivência, sendo bons padrões para um estudo aprofundado de suas cargas genéticas e características, além das consequências de sua existência. Isso fica evidenciado ao perceber que todas as 11 bactérias alcançaram pontuação de mais de 60% para ambos os atributos considerados essenciais tanto pela classificação da máquina *Fuzzy* quanto pelas especialistas.

4. Conclusões

A aplicação da Máquina *Fuzzy* se mostrou muito útil para auxiliar na tomada de decisões e auxiliar na classificação do perfil de cada bactéria, pois através da mesma foi possível condensar diversas regras criando um classificador funcional e até mesmo replicável a outros micro-

Tabela 2: Resultado Final das classificações das bactérias

Execuções	Tamanho	Score Parcial	Score Unique	Nota Fuzzy		Nota Especialista	
				Adaptabilidade	Sobrevivência	Adaptabilidade	Sobrevivência
1	2395	3809	16,47	0,656	0,661	0,611	0,67
2	2397	3809	18,5	0,657	0,714	0,62	0,73
3	2400	3829	13,52	0,671	0,653	0,7	0,66
4	2397	3799	17,72	0,621	0,685	0,6	0,69
5	2400	3842	15,96	0,814	0,655	0,76	0,665
6	2399	3821	16,05	0,653	0,654	0,605	0,665
7	2399	3817	18,1	0,655	0,696	0,61	0,71
8	2398	3825	17,42	0,656	0,677	0,611	0,68
9	2398	3812	15,12	0,651	0,651	0,609	0,66
10	2400	3816	17,51	0,654	0,678	0,61	0,685
11	2400	3803	12,99	0,649	0,646	0,609	0,65

organismos. Podemos observar que após execuções dos algoritmos foi possível gerar mutantes híbridos humano e peixe factíveis que tiveram bons resultados para adaptabilidade e sobrevivência. As opiniões das especialistas nas classificações das bactérias foram bem próximas da classificação realizada pela máquina *Fuzzy*, mostrando que a mesma está bem calibrada para esta função. Dependendo do perfil desejado de cada bactéria e do objetivo, podem ser selecionadas diferentes bactérias. Por exemplo no caso de melhor bactéria com melhor capacidade adaptativa seria a bactéria 5 que possui valor de 0,814 de acordo com a máquina *Fuzzy* e 0,760 na opinião da especialista. Já no caso de melhor bactéria com maior capacidade de sobrevivência seria a bactéria 2 com valor de 0,714 atribuído pela máquina *Fuzzy* e 0,730 de acordo com a especialista.

Agradecimentos

O primeiro autor agradece a Deus, família, amigos, aos demais autores, Santa Casa-BH e CEFET-MG.

Referências

- ALMEIDA, Paulo Eduardo Maciel de, and Alexandre Gonçalves Evsukoff. **Sistemas fuzzy. Rezende, SO Sistemas Inteligentes: fundamentos e aplicações.** Barueri, SP: Manole, Cap 7 (2003).
- GOLDBERG, David E., and John H. HOLLADND. **Genetic algorithms and machine learning.** Machine learning 3.2 (1988).
- JUNIOR, M. J. P.; CHAN, E.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações. Vol. 1.** [S.l.]: São Paulo, Makron Books, 1996.
- LINDEN, R. **Algoritmos genéticos (2a edição).** [S.l.]: Brasport, 2008.
- LPSN, L. o. P. n. w. s. i. n. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature.** 2018. Disponível em: <http://www.bacterio.net/streptococcus.html>. Acesso em: 1 de junho de 2018.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14a Edição.** [S.l.]: Artmed Editora, 2016.
- METROPOLES, N. et al. **Equation of state calculations by fast computing machines.** The journal of chemical physics, AIP, vol 21, n 6, p. 1953.
- NCBI, N. C. f. B. I. **PubMed Search - Streptococcus.** 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Streptococcus>. Acesso em: . Acesso em: 1 de junho de 2018.
- KIRKPATRICK, Scott, C. Daniel Gelatt, and Mario P. Vecchi. **Optimization by simulated annealing.** Science 220.4598 (1983): 671-680.
- QUINN, P. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** [S.l.]: Artmed Editora, 2005.
- TORTOTA, G. J.; Case, C. L.; Funke, B. R. **Microbiologia-12a Edição.** [S.l.]: Artmed Editora, 2016

Abstract.

*Microorganisms can be classified and observed in different biological kingdoms, being widely distributed by nature, detected in the most inhospitable places, directly affecting the environmental pattern and other organisms. In this work, mutant artificial bacteria of *Streptococcus agalactiae* will be generated by means of Genetic Algorithms and Meta-Heuristics, followed by pangenoma analyzes of the species, combining the clusters of genes of the lines found in the fish *Tilapia* (*Oreochromis sp.*) And with those of Humans (*Homo sapiens*), their later classification in a machine of inference Fuzzy with the model Mamdani. Aiming to aid genomic studies among possible bacterial profiles and to develop comparative analyzes necessary to assist in the creation of a new human genomic hybrid profile with the fish genes, in order to prepare for a possible outbreak and how to treat them in a preventive way. The application of the Fuzzy Machine proved to be very useful in helping to make decisions and classifications of bacterial profiles. After execution of the algorithms, it was possible to generate new hybrid mutants with human and fish profile feasible, which obtained good results for adaptability and survival.*

Palavras-chave: *Systems Fuzzy, Artificial Organisms, Computational Intelligence, *Streptococcus agalactiae*.*