

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária

Yasmin Gonçalves de Castro

Caracterização de *Streptococcus didelphis* isolados de múltiplos sítios de lesões em gambás (*Didelphis* spp.)

Belo Horizonte

2023

Yasmin Gonçalves de Castro

Caracterização de *Streptococcus didelphis* isolados de múltiplos sítios de lesões em gambás (*Didelphis spp.*)

Monografia apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista – Residência em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Sanidade e Diagnóstico de Doenças Animais e Zoonóticas.

Tutor: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

**Belo Horizonte
2023**

Castro, Yasmin Gonçalves de, 1996-
C355C Caracterização de *Streptococcus didelphis* isolados de múltiplos sítios de lesões em gambás (*Didelphis spp.*) / Yasmin Gonçalves de Castro. – 2023. 24f.: il

Orientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título Especialista Residência em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Sanidade e Diagnóstico de Doenças Animais e Zoonóticas.

Bibliografias: f:20 a 23.

1. Animais silvestres - Doenças - Teses - 2. Streptococcus - Teses - 3. Microbiologia veterinária - Teses - I. Silva, Rodrigo Otávio Silveira - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.

ATA DE DEFESA DE TCR DE Yasmin Gonçalves de Castro

Às 9:00 horas do dia 21/11/23, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso, para julgar em exame final, a defesa do TCR intitulado: Caracterização de Streptococcus didelphis isoladas de múltiplos sítios de lesões em gambás (Didelphis spp.).

como requisito final para a obtenção do Título de Especialista em

Abrindo a sessão, o Presidente da Banca, **Prof. Rodrigo O. S. Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa do TCR, passou a palavra ao candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Banca se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da TCR, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Aprovada	Reprovada
----------	-----------

Prof. Erica Azevedo Costa
 Prof. Rafael Gariglio Clark Xavier
 Prof. Rodrigo Otávio Silveira Silva

<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado

Reprovado

Nota: 100,0

Para concluir o Programa, o (a) candidato (a) deverá depositar no repositório Institucional a referida produção acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca. Para tanto terá o prazo máximo de 30 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Banca. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Banca Examinadora.

Belo Horizonte, 21 de novembro de 2023.

Assinatura dos membros da Banca:

Rodrigo O. S. Silva

Erica Azevedo Costa

Rafael Gariglio Clark Xavier

(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador e não poderá conter rasuras)

RESUMO

Bactérias do gênero *Streptococcus* são cocos gram-positivos, dispostos em arranjo de cadeia, imóveis, anaeróbios facultativos e catalase negativos. Grande parte destes microrganismos fazem parte da microbiota do hospedeiro e são considerados oportunistas. Dentre as espécies de importância na medicina humana e animal, destacam-se *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. suis* e *S. equi*. Já o conhecimento acerca do gênero *Streptococcus* em animais silvestres é limitado. Recentemente, identificou-se uma nova espécie de *Streptococcus*, em gambás (*Didelphis virginiana*), nomeada *Streptococcus didelphis*, capaz de causar infecção em diferentes tecidos. O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotipicamente estirpes de *S. didelphis* isolados de gambás quanto ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, formação de biofilme e detecção de atividade de catalase. Os isolados foram obtidos de casos de infecção em gambás submetidos, entre 2021 e 2023, a pesquisa bacteriológica. As amostras de múltiplos sítios foram plaqueadas em ágar sangue e ágar MacConkey, e as colônias foram identificadas por espectrometria de massa (MALDI-ToF). A suscetibilidade antimicrobiana foi testada pelo método de disco-difusão. Testou-se também a capacidade de produção de biofilmes pelas estirpes, além da verificação da atividade de catalase. O teste de suscetibilidade revelou que a maior parte dos isolados foi suscetível à maioria dos antimicrobianos testados, com 20% dos isolados resistentes à ampicilina, cefoxitina, penicilina e tetraciclina. Três isolados foram considerados multirresistentes. Nenhum dos isolados foi capaz de produzir biofilme, e todos foram positivos na prova da catalase. O presente estudo sugere que *S. didelphis* está associado a quadros infecciosos em gambás, e que apesar de esses animais viverem em ambientes urbanos e periurbanos a taxa de resistência encontrada foi baixa.

Palavras-chave: *Streptococcus didelphis*; gambás; infecção.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Streptococcus* are gram-positive cocci, arranged in a chain, immobile, facultative anaerobes and catalase negative. Most of these microorganisms are part of the host's microbiota and are considered opportunistic. Among the species of importance in human and animal medicine are *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. suis* and *S. equi*. Knowledge about the genus *Streptococcus* in wild animals is limited. Recently, a new species of *Streptococcus* was identified in opossums (*Didelphis virginiana*), named *Streptococcus didelphis*, capable of causing infection in different tissues. The aim of this study was to phenotypically characterize *S. didelphis* strains isolated from opossums in terms of their antimicrobial susceptibility profile, biofilm formation and detection of catalase activity. The isolates were obtained from cases of infection in opossums that underwent bacteriological research between 2021 and 2023. Samples from multiple sites were plated on blood agar and MacConkey agar, and the colonies were identified by mass spectrometry (MALDI-ToF). Antimicrobial susceptibility was tested using the disk-diffusion method. The strains ability to produce biofilms was also tested, as well as catalase activity. The susceptibility test revealed that most of the isolates were susceptible to the majority of the antimicrobials tested, with 20% of the isolates resistant to ampicillin, cefoxitin, penicillin and tetracycline. Three isolates were considered multi-resistant. None of the isolates were able to produce biofilm, and all were positive in the catalase test. This study suggests that *S. didelphis* is associated with infectious conditions in opossums, and that despite the fact that these animals live in urban and peri-urban environments, the resistance rate found was low.

Keywords: *Streptococcus didelphis*; opossums; infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Colônias de <i>S. didelphis</i> em ágar BHI suplementado com 5% de sangue equino.....	15
Figura 2: Aspecto microscópico das colônias de <i>S. didelphis</i> em coloração de Gram.....	16
Figura 3: Reação positiva na prova da catalase.....	18
Gráfico 1: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de <i>S. didelphis</i>	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação das espécies bacterianas isoladas em diversos sítios de diferentes hospedeiros.....	14
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection

BHI - Ágar infusão cérebro-coração

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DMVP – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

EV – Escola de Veterinária

MDR – Multiple drug resistance

MC - Ágar MacConkey

MH – Ágar Mueller Hinton

PBS 1x - Tampão salina fosfato modificado

TSA – Ágar Triptona de soja

TSB – Caldo Triptona de soja

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
	2.1 <i>Didelphis</i> spp.	9
	2.2 <i>Streptococcus</i> spp.	9
	2.3 Biofilme	11
	2.4 Resistência antimicrobiana	11
3	OBJETIVOS	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	12
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Streptococcus*, membros da família *Streptococcaceae*, são cocos gram-positivos, dispostos em arranjo de cadeia (Melville et al., 2016; Haenni et al., 2018; Lannes-Costa et al., 2021). São microrganismos imóveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, catalase negativos e apresentam metabolismo fermentativo (Melville et al., 2016; Whiley e Hardie, 2015).

Alguns destes microrganismos fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal, vias respiratórias superiores, mucosa oral e trato geniturinário, sendo potencialmente patogênicos quando a resposta imunológica do hospedeiro é comprometida, sendo considerado um microrganismo oportunista (Melville et al., 2016; Haenni et al., 2018). Entretanto, algumas espécies são capazes de causar infecções primárias, como *Streptococcus equi*, agente causador do garrotilho em equídeos (Mallicote, 2015; Boyle, 2023). Além do *S. equi*, outras espécies patogênicas em seres humanos e animais destacam-se, tais como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* e *S. suis* (Lun et al., 2007; Mallicote, 2015; Haas e Grenier, 2018; Lannes-Costa et al., 2021)

Infecções resultam da interação patógeno-hospedeiro, processo que pode incluir a adesão do microrganismo a componentes da parede celular ou da matriz extracelular do hospedeiro, produção de toxinas e até mesmo a internalização do microrganismo na célula (Nobbs et al., 2009; Lannes-Costa et al., 2021). O conhecimento acerca do gênero *Streptococcus* em animais silvestres é limitado, e grande parte dos trabalhos relatam apenas a colonização por estes microrganismos (Takada et al., 2010; Vela et al., 2015; Vela et al., 2016). Por outro lado, alguns estudos têm identificado o gênero como causador de infecções em algumas espécies como *Streptococcus castoreus* (Mühldorfer et al., 2019), *Streptococcus phocae* (Taurisano et al., 2018), *Streptococcus catagoni* (Mühldorfer et al., 2020). Nesse contexto, há mais de 20 anos atrás, relatou-se uma nova espécie de *Streptococcus*, em gambás (*Didelphis virginiana*), nomeada *Streptococcus didelphis*, capaz de causar infecção (Rurangirwa et al., 2000). Porém, desde então, nenhum outro trabalho relatou esse microrganismo causando infecção ou colonizando, e a importância do *S. didelphis* permanece obscura.

Gambás se adaptam em ambientes urbanos e periurbanos, o que os mantém próximos a seres humanos e animais domésticos, são considerados animais relevantes do ponto de vista epidemiológico pelo alto risco de transmissão de patógenos importantes para a saúde pública (Jansen, 2006; Bezerra-Santos et al., 2021; Santana et al., 2021; Braga et al., 2023). Estudos

relatam, por exemplo, a detecção de diversos patógenos zoonóticos nesses animais, desde virais, como o vírus vaccinia (Peres et al., 2018), bacterianos, como *Brucella abortus* (Schnurrenberger et al., 1985) e parasitários como *Trypanossoma cruzi* (Bezerra-Santos et al., 2021), *Leishmania infantum*, (Schallig et al., 2007; Bezerra-Santos et al., 2021), *Ancylostoma* spp. (Bezerra-Santos et al., 2020; Bezerra-Santos et al., 2021). Porém, até o momento, são raros os estudos com bactérias do gênero *Streptococcus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Didelphis* spp.

Gambás são mamíferos marsupiais, pertencentes à família *Didelphidae* (Jansen, 2006; Nascimento e Horta, 2014). Esta família abriga o gênero *Didelphis*, ao qual pertencem os gambás. No Brasil, podem ser encontradas as espécies *Didelphis albiventris*, *D. aurita*, *D. imperfecta* e *D. marsupialis* (Faria, 2019). De modo geral, são animais solitários, de hábitos noturnos e onívoros, com uma dieta considerada generalista, se alimentando de insetos, pequenas aves, frutos, néctar e animais em decomposição (Nascimento e Horta, 2014; Faria, 2019). Gambás são animais sinantrópicos, altamente adaptados ao contato com seres humanos, sendo encontrados em ambientes urbanos, periurbanos, rurais e florestas nativas (Jansen, 2006; Faria, 2019; Braga et al., 2023).

A proximidade destes animais com seres humanos e outros animais, sejam eles domésticos ou silvestres, é preocupante, pois os gambás podem atuar como hospedeiros e reservatórios de patógenos de importância para a saúde pública, como *Trypanossoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Rickettsia* spp., dentre outros (Jansen, 2006; Faria, 2019; Braga et al., 2023; Bezerra-Santos et al., 2021, Santana et al., 2021). Apesar disso, devemos lembrar que esses animais desenvolvem um importante papel ecológico nos diferentes ambientes em que se encontram, como dispersão de sementes e controle de artrópodes, como escorpiões, aranhas e carrapatos (Bezerra-Santos et al., 2021).

2.2 *Streptococcus* spp.

Streptococcus são bactérias em formato de cocos gram-positivos, arranjados em formato de cadeia ou em pares (Lannes-Costa et al., 2021). As colônias possuem formato

esférico e possuem diâmetro inferior a 2 mm (Whiley e Hardie, 2015). Esses microrganismos são imóveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, catalase negativos e possuem metabolismo fermentativo (Melville et al., 2016; Whiley e Hardie, 2015). Por serem microrganismos fastidiosos, requerem meios de cultura ricos em nutrientes para cultivo em laboratório, com suplementação de sangue, soro ou glicose; ademais são microrganismos capnofílicos, apresentando bom crescimento em concentrações elevadas de CO₂ (Whiley e Hardie, 2015).

Podem ser classificados quanto ao tipo de hemólise observada após o crescimento em ágar sangue, sendo do tipo α (alfa, hemólise parcial), β (beta, hemólise total) ou γ (gama, ausência de hemólise) (Melville et al., 2016; Haenni et al., 2018). Conforme as características antigênicas do carboidrato C da parede celular, também são classificados em grupos, de A a W; entretanto, algumas espécies do gênero não são classificáveis (Haenni et al., 2018). Ademais, testes bioquímicos também podem ser usados para diferenciar as principais espécies (Quinn, 2007; Melville et al., 2016).

Entre as principais espécies patogênicas em seres humanos e animais, destacam-se *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi* e *S. suis* (Mallicote, 2015; Haas e Grenier, 2018; Lannes-Costa et al., 2021). *S. pneumoniae* é o principal agente envolvido em pneumonia e meningite bacteriana em seres humanos (Mitchell e Mitchell, 2010). Já o *S. pyogenes* é um patógeno de relevância na saúde pública, sendo causa de amplas manifestações, leves e graves, como faringite, erisipela, pneumonia, Síndrome do Choque Tóxico Estreptocócico, dentre outros (Brouwer et al., 2016; Lannes-Costa et al., 2021). Recentemente, um possível surto de *S. pyogenes* levou ao óbito de três crianças em um município de Minas Gerais (BRASIL, 2023). *S. agalactiae* é causa de sepse, meningite, pneumonia em neonatos e aborto em mulheres grávidas, já em animais, mastite, infecção articular e meningite são comumente relatados. *S. equi*, especificamente da subespécie *equi*, é o agente causador do garrotilho em equídeos, doença que traz complicações como as infecções metastáticas (Mallicote, 2015). Já *S. suis* é um agente zoonótico emergente, associado a meningite estreptocócica em leitões, eventualmente afetando também seres humanos que lidam diretamente com esses animais (Lun et al., 2007).

Diversos fatores de virulência apresentados pelas diferentes espécies contribuem para o estabelecimento e manutenção da infecção, como a presença da cápsula, recurso pelo qual a bactéria consegue escapar da resposta imune do hospedeiro; além da produção de toxinas citolíticas, proteínas de adesão, invasão a células do hospedeiro e de formação de biofilme (Mitchell e Mitchell, 2010; Lannes-Costa et al., 2021).

2.3 Biofilme

O processo de formação do biofilme se inicia por meio da adesão dos microrganismos a superfícies abióticas ou mesmo em tecidos do hospedeiro, seguido pelo estágio de multiplicação e maturação, e dispersão (Domenech et al., 2012; Speziale e Geoghegan, 2015; Tolker-Nielsen, 2015). Diversas espécies de *Streptococcus* são sabidamente formadores de biofilme, à exemplo do *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, dentre outros (Speziale e Geoghegan, 2015). Tal característica contribui para a sobrevivência e persistência do microorganismo *in situ* (Speziale e Geoghegan, 2015). E sua importância se deve ao fato de essa estrutura proteger os microrganismos envolvidos da ação do sistema imune e também dos antimicrobianos (Domenech et al., 2012; Speziale e Geoghegan, 2015), resultando em doenças crônicas (Domenech et al., 2012; Tolker-Nielsen, 2015).

2.4 Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é um problema global, visto que reduz as possibilidades de tratamento para doenças infecciosas, acarretando em tratamentos mal sucedidos, cronificação da infecção e até óbito (Magiorakos et al., 2012; McEwen e Collignon, 2018). O surgimento de estirpes resistentes se deve a uma série de fatores, como o uso indiscriminado de antimicrobianos, seja nos setores de saúde humana ou animal, além de fatores ambientais, como o descarte e tratamento inadequado de efluentes industriais e domésticos (McEwen e Collignon, 2018; Aslam et al., 2021; Serna e Gonzalez-Zorn, 2022). Os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes a antimicrobianos incluem a mutação em genes envolvidos em alguma etapa de ação da droga (bombas de efluxo, modificação do alvo, redução da absorção), e a transferência horizontal de genes (transformação, transdução e conjugação) (Munita e Arias, 2016).

Na produção animal, antimicrobianos são usados de forma preventiva, para melhorar a produtividade dos animais, além do uso para o tratamento de infecções (Aslam et al., 2021). Já na medicina humana, o uso de antimicrobianos tem finalidade terapêutica, como o tratamento de infecções, e uso profilático após procedimentos cirúrgicos (Aslam et al., 2021). Apesar de as áreas apresentarem algumas finalidades de uso divergentes, a consequência da resistência impacta ambos, pois antimicrobianos usados na produção animal, também são

usados na medicina humana, além do que existe a possibilidade de disseminação de microrganismos interespecies (Hwang e Gums, 2016; Aslam et al., 2021).

Levando em consideração que a resistência é multicausal, para sua mitigação o conceito de saúde única deve ser aplicado (Magiorakos et al., 2012). Para isso, ações como a eliminação do uso inadequado de antimicrobianos, redução da prescrição excessiva de antimicrobianos, melhora do saneamento, higiene e do controle de infecções são necessárias (McEwen e Collignon, 2018).

3 OBJETIVOS

Caracterizar fenotipicamente estirpes de *S. didelphis* isolados de gambás quanto ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, formação de biofilme e detecção de atividade de catalase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Entre os anos de 2021 e 2023 foram recebidas amostras de 14 animais capturados ou necropsiados pelo setor de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Os animais habitavam seis locais diferentes: o Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Parque das Mangabeiras Maurício Campos, Parque Municipal Fazenda Lagoa do Nado, Parque Municipal Ursulina de Andrade Mello, Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte e Campus Pampulha da UFMG, todos localizados no município de Belo Horizonte (Minas Gerais). Amostras foram coletadas de diferentes sítios com lesão, tais como fígado, baço, rim, pulmão, peritônio e lesão de pele (Tabela 1). Foram coletados suabes das lesões e esses foram enviados refrigerados para o processamento no Laboratório de Bacterioses e Pesquisa do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da EV-UFMG.

Os suabes foram plaqueados em ágar infusão cérebro-coração (BHI, Kasvi) acrescido com 5% de sangue equino, e ágar MacConkey (MC, TM Media), e incubadas a 37°C por 48h em condições de aerobiose. Após crescimento, as colônias foram submetidas à técnica de coloração de Gram para visualização microscópica de sua morfologia. Posteriormente, amostras sugestivas de *S. didelphis* foram submetidas a identificação da espécie bacteriana por espectrometria de massa (MALDI-ToF; do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption*

Ionization - Time of Flight; Bruker Daltonics). As análises foram realizadas com colônias puras de acordo com as instruções do fabricante, considerando um escore de confiança $\geq 2,0$ para identificação em nível de espécie (Bizzini et al., 2010; Neville et al., 2011).

A suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *S. didelphis* foi avaliada pelo método de disco-difusão (CLSI, 2020). Colônias puras foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) a uma escala de turbidez de 0,5 de McFarland. Posteriormente, foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (MH, Kasvi) suplementado com 5% de sangue equino, seguida da adição de discos com os antimicrobianos. Foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 μg), cefotaxima (30 μg), clindamicina (2 μg), cloranfenicol (30 μg), eritromicina (15 μg), penicilina (10 μg) e tetraciclina (30 μg). As placas foram incubadas a 37°C por 24h, em aerobiose. Após o período de incubação, o diâmetro dos halos de inibição foi medido em milímetros e os resultados foram interpretados como sensível, intermediário ou resistente, de acordo com os critérios estabelecidos no CLSI (2020) para *Streptococcus* spp. do grupo β -hemolíticos.

A capacidade de produção de catalase dos isolados foi realizada através da inoculação das amostras em lâminas de microscopia, seguida da adição de peróxido de hidrogênio 3%. Foram consideradas positivas as amostras em que houve formação de bolhas após adição de peróxido de hidrogênio 3%. Já a capacidade de produção de biofilme pelas estirpes foi realizada de acordo com (Stepanović et al., 2007). Os isolados foram semeados em placas de Petri contendo Ágar Triptona de soja (TSA, Oxoid), e posteriormente foram incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose. Após crescimento, colônias puras foram suspensas em PBS 1X (tampão salina fosfato modificado), seguindo a escala de turbidez de 0,5 de McFarland. As suspensões bacterianas foram feitas em triplicata biológica. Em seguida, as amostras foram inoculadas em placas de poliestireno, contendo caldo Triptona de soja (TSB, Oxoid) + 1% de glicose. Amostras de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 foram utilizadas como controle positivo, enquanto poços contendo TSB sem o inóculo bacteriano foram utilizados como controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C por 24h em aerobiose. Posteriormente, foi realizada lavagem com PBS 1X, seguida da fixação através da incubação a 60°C, coloração com safranina 0,1%, seguida de nova lavagem com PBS 1X e, por fim, solubilização do corante com álcool 92%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (492nm) (Thoth, Brasil).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gambás são marsupiais de hábito generalista quanto a alimentação e habitat, o que permite seu trânsito e adaptação em diferentes ambientes, sejam eles urbanos, onde podem ter contato com seres humanos e outros animais domésticos, ou animais silvestres na natureza (Faria, 2019; Braga et al., 2023). Tal fator levanta a necessidade da compreensão dos microrganismos que levam ao adoecimento deste animal sinantrópico, visto que podem se comportar como reservatórios e transportadores de patógenos de importância para saúde humana e animal (Braga et al., 2023).

Entre as amostras analisadas, *S. didelphis* foi isolado de lesões em diversos órgãos e sítios: baço, cavidade abdominal, fígado, pele, peritônio, pulmão e subcutâneo (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação das espécies bacterianas isoladas em diversos sítios de diferentes hospedeiros.

Identificação	Hospedeiro	Fonte de isolamento	Bactérias isoladas
B61/21	<i>Didelphis albiventris</i>	Fígado, baço e rim	<i>S. didelphis</i>
21073	<i>Didelphis albiventris</i>	Pulmão	<i>S. didelphis, Proteus mirabilis</i>
B65/22	<i>Didelphis albiventris</i>	Lesão na cauda	<i>S. didelphis</i>
B69/22	<i>Didelphis albiventris</i>	Tecido subcutâneo	<i>S. didelphis</i>
B125/22	<i>Didelphis albiventris</i>	Abscesso no baço	<i>S. didelphis, Staphylococcus xylosum</i>
		Peritônio	<i>S. didelphis, Escherichia coli</i>
PS30/22	<i>Didelphis aurita</i>	Pele (lesão)	<i>S. didelphis</i>
PS75/23	<i>Didelphis albiventris</i>	Pele (lesão)	<i>S. didelphis</i>
PS76/23	<i>Didelphis albiventris</i>	Pele (lesão)	<i>S. didelphis</i>
PS81/23	<i>Didelphis albiventris</i>	Pele (lesão)	<i>S. didelphis</i>
B84/23	<i>Didelphis albiventris</i>	Lesão no dígito	<i>S. didelphis, Staphylococcus sciuri, Morganella morganii</i>

Identificação	Hospedeiro	Fonte de isolamento	Bactérias isoladas
PS106/23	<i>Didelphis albiventris</i>	Lesão nasal	<i>S. didelphis</i>
PS110/23	<i>Didelphis albiventris</i>	Pele (lesão)	<i>S. didelphis</i>
PS113/23	<i>Didelphis albiventris</i>	Lesão na mandíbula	<i>S. didelphis</i>
PS114/23	<i>Didelphis albiventris</i>	Lesão nasal	<i>S. didelphis</i>

Nenhuma das amostras desse estudo apresentou crescimento em ágar MC, corroborando os resultados encontrados por Rurangirwa e colaboradores (2000). No ágar BHI suplementado com sangue equino (5%), as colônias mostraram pequeno diâmetro, aspecto translúcido, e foi observada beta-hemólise (Figura 1).

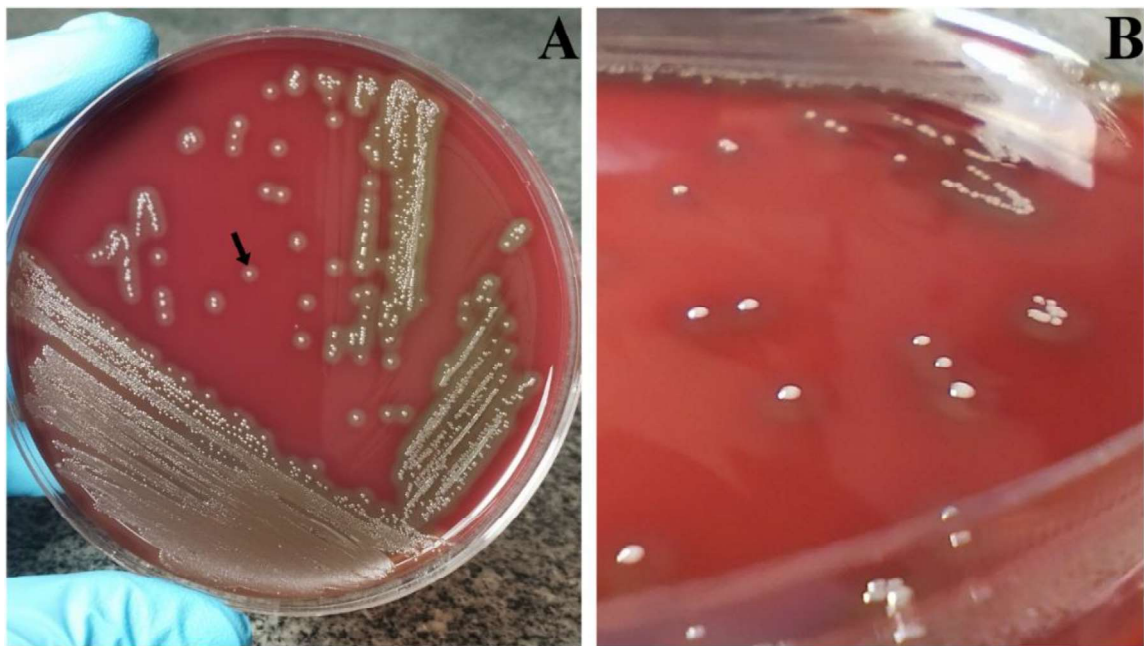


Figura 1: Colônias de *S. didelphis* em ágar BHI suplementado com 5% de sangue equino. Observam-se colônias pequenas, translúcidas, redondas e beta-hemolíticas.

Na avaliação microscópica das colônias, após coloração de Gram, foram observados cocos gram-positivos em arranjo de cadeia (Figura 2), morfologia tipicamente associada a bactérias do gênero *Streptococcus*.

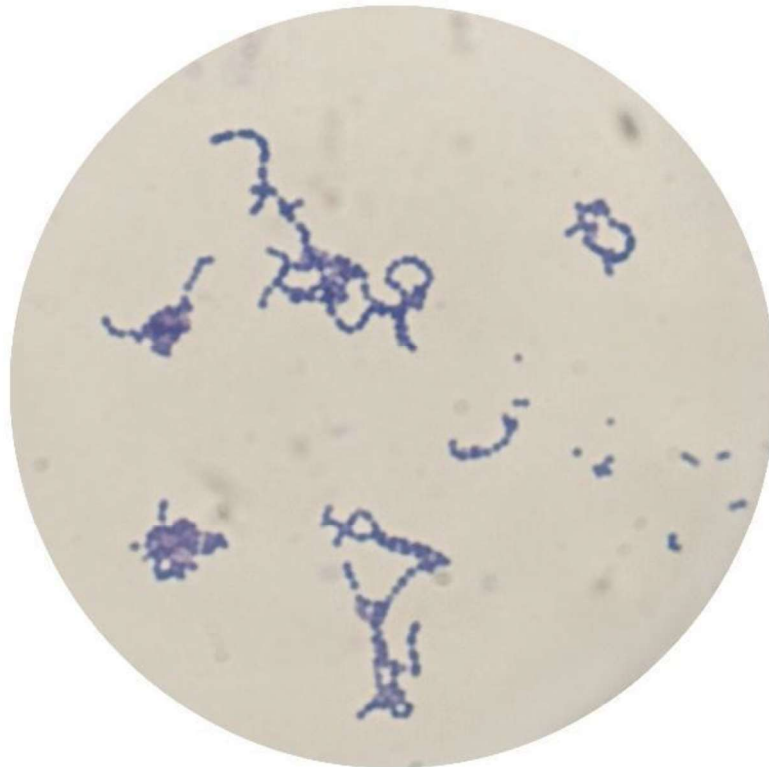


Figura 2: Aspecto microscópico das colônias de *S. didelphis* em coloração de Gram. Visualização na objetiva de 100x.

Streptococcus são responsáveis por inúmeras doenças, que acometem diversas espécies e em sítios variados, como garrotilho, meningite estreptocócica, mastite, pneumonia, endocardite, sepse e infecções de pele (Mallicote, 2015; Haas e Grenier, 2018; Lannes-Costa et al., 2021). Frequentemente ocorrem lesões supurativas e formação de abscessos (Melville et al., 2016; Molinari e Chhatwal, 1999). No presente estudo, *S. didelphis* foi encontrado infectando diversos órgãos, sugerindo uma capacidade de infecção em diferentes sítios do hospedeiro.

Em animais silvestres, o isolamento de novas espécies de *Streptococcus* tem sido descrito na literatura, seja apenas como agente colonizador ou causador de infecções, como o *S. catagoni* em queixadas (*Catagonus wagneri*) (Mühldorfer et al., 2020), *S. phocae* em animais marinhos (Taurisano et al., 2018), *S. caprae* em ibex ibérico (*Capra pyrenaica hispanica*) (Vela et al., 2016), *S. pharyngis* em coelhos selvagens (*Oryctolagus cuniculus*) (Vela et al., 2015), *S. dentapri* em javalis (*Sus scrofa*) (Takada et al., 2010), *S. castoreus* em castores (*Castor fiber*) (Mühldorfer et al., 2019), *S. didelphis* em gambás (*Didelphis virginiana*) (Rurangirwa et al., 2000), dentre outros relatos.

Infecções dependem da interação do patógeno com o hospedeiro (Nobbs et al., 2009). A adesão do microrganismo à superfície celular ou ainda a outros componentes da matriz extracelular é fundamental para o estabelecimento da infecção (Nobbs et al., 2009). Nas bactérias do gênero *Streptococcus*, este passo ocorre devido à expressão de diferentes polipeptídios ancorados ou não à parede celular bacteriana – adesinas (Nobbs et al., 2009; Brouwer et al., 2016). A expressão de múltiplas adesinas permite que estes patógenos sejam capazes colonizar diferentes tecidos, podendo causar infecções sistêmicas (Melville et al., 2016; Nobbs et al., 2009). O conhecimento acerca de adesinas específicas no *S. didelphis* é inexistente. Nesse sentido, o número de isolados neste estudo permite o aprofundamento nessa caracterização em estudos futuros.

Antes, acreditava-se que, após a adesão, bactérias do gênero *Streptococcus* se mantinham no meio extracelular, e seus mecanismos de virulência consistiam na ligação em componentes da matriz extracelular e na produção de toxinas (exotoxinas pirogênicas, hemolisinas, hialuronidase, estreptoquinase, protease, dentre outras moléculas) (Molinari e Chhatwal, 1999). Porém, hoje sabe-se que alguns *Streptococcus* são capazes de invadir células não fagocíticas (Molinari e Chhatwal, 1999; Nobbs et al., 2009; Brouwer et al., 2016). Apesar de o papel da invasão celular para o gênero e os mecanismos nela envolvidos não estejam bem estabelecidos, ao que parece, alguns *Streptococcus* patogênicos para animais e membros do grupo A usam o mecanismo de invasão celular para a persistência bacteriana, enquanto os *Streptococcus* do grupo B e pneumococos o usam com objetivo de disseminação sistêmica (Molinari e Chhatwal, 1999; Nobbs et al., 2009). O mecanismo de internalização contribui para persistência bacteriana pois protege o microrganismo do sistema imune do hospedeiro e também da ação dos quimioterápicos (Nobbs et al., 2009). Outros fatores também contribuem para a patogenicidade destes microrganismos, como as cápsulas polissacarídicas com função antifagocitária, presente em algumas espécies (Molinari e Chhatwal, 1999; Nobbs et al., 2009; Lannes-Costa et al., 2021).

Diferente de outros representantes do gênero, *S. didelphis* apresenta atividade de catalase, mas essa atividade é perdida após sucessivas subculturas do microrganismo (Rurangirwa et al., 2000). A espécie é não reagente ao Teste de agrupamento de Lancefield, método sorológico que classifica o gênero *Streptococcus* com base em um carboidrato grupo-específico, o polissacarídeo C (Melville et al., 2016; Rurangirwa et al., 2000). Suas características bioquímicas e fisiológicas incluem a produção de ácido a partir da ribose e trealose, hidrólise de arginina e hipurato, além da produção de fosfatase alcalina, Beta-D-

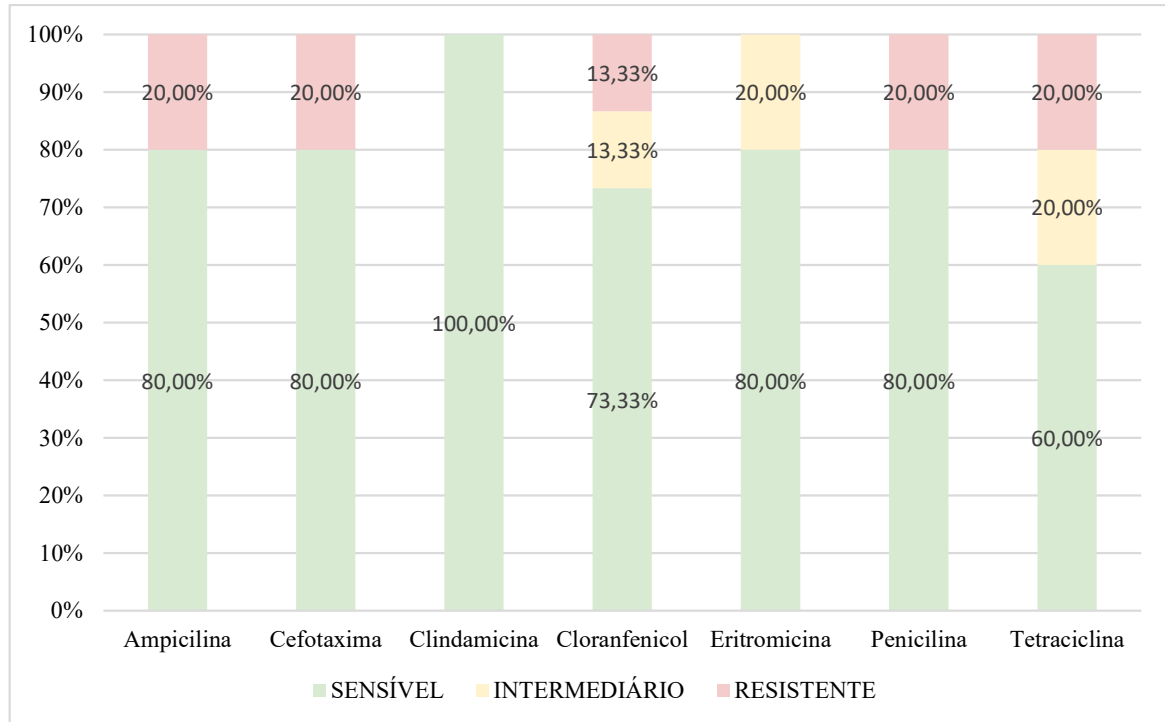
Glucuronidase e leucina arilamidase. Os mecanismos de virulência dessa espécie não estão bem definidos (Melville et al., 2016; Whiley e Hardie, 2015).

Assim como encontrado por Rurangirwa et. al. (2000), todos os isolados de nosso trabalho demonstraram atividade vigorosa da enzima catalase (Figura 3). Nenhum dos isolados foi capaz de formar biofilme *in vitro*, contrastando com outras espécies do gênero *Streptococcus*, como *Streptococcus mutans*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* e *S. pyogenes* (Domenech et al., 2012; Krzyściak et al., 2014; Speziale e Geoghegan, 2015).



Figura 3: Reação positiva na prova da catalase em um isolado de *Streptococcus didelphis*.

No presente estudo, a resistência a ampicilina (20%), cefoxitina (20%), penicilina (20%) e tetraciclina (20%) foram as mais frequentes (Gráfico 1). Dos quatro isolados que apresentaram alguma resistência, 100% foram resistentes à classe das penicilinas, 75% foram resistentes à classe das cefalosporinas e tetraciclina e 50% foram resistentes à classe dos fenicóis. Ainda, três isolados (75%) foram classificados como multirresistentes, definição dada a microrganismos resistentes a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012).

Gráfico 1: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de *S. didelphis*.

Apesar da detecção de isolados multirresistentes, o número de isolados sensíveis a todos antimicrobianos testados foi alto. Este resultado não é surpreendente já que os isolados foram obtidos de animais de vida livre que, muito provavelmente, nunca foram submetidos ao uso de antimicrobianos. Ainda assim, a detecção de *S. didelphis* multirresistente reforça que o trânsito de animais sinantrópicos nos diferentes ambientes pode acarretar na disseminação de patógenos resistentes, além da troca de genes de resistência entre bactérias, através de mecanismos de transferência horizontal (Carroll et al., 2015; Munita e Arias, 2016; Furness et al., 2017; Santana et al., 2021).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Streptococcus são bactérias comensais, e potenciais causadores de infecções em animais domésticos, silvestres e em seres humanos. No presente estudo, foi possível isolar e caracterizar *S. didelphis* de diferentes sítios de lesões em gambás. Todos isolados foram catalase positivos e a maior parte apresentou sensibilidade a todos antimicrobianos testados. Porém, chama a atenção a detecção de três estirpes multirresistentes em animais que, provavelmente, nunca fizeram uso de antimicrobianos. Faz-se necessário mais estudos para

elucidar quais os principais mecanismos de virulência apresentados por este microrganismo, que o permitem estabelecer infecção em locais diversos do hospedeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASLAM, B.; KHURSHID, M.; ARSHAD, M.I.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M.; YASMEEN, N.; SHAH, T.; CHAUDHRY, T.H.; RASOOL, M.H.; SHAHID, A.; XUESHAN, X.; BALOCH, Z. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.11, p.771510, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.771510.

BEZERRA-SANTOS, M.A.; FONTES, C.S.; NOGUEIRA, B.C.F.; YAMATOGLI, R.S.; RAMOS, R.A.N.; GALHARDO, J.A.; FURTADO, L.F.V.; RABELO, É.M.L.; ARAÚJO, J.V. DE; CAMPOS, A.K. Gastrointestinal parasites in the opossum *Didelphis aurita*: Are they a potential threat to human health? **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v.44, p.355–363, 2020. DOI: 10.1007/s12639-020-01205-9.

BEZERRA-SANTOS, M.A.; RAMOS, R.A.N.; CAMPOS, A.K.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. **Parasitology Research**, v.120, p.4091–4111, 2021. DOI: 10.1007/s00436-021-07072-4.

BOYLE, A.G. *Streptococcus equi* Subspecies *equi*. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Equine Infectious Diseases. v.39, p.115–131, 2023. DOI: 10.1016/j.cveq.2022.11.006.

BRAGA, M. DO S.C.O.; COSTA, F.B.; CALCHI, A.C.; MELLO, V.V.C. DE; MONGRUEL, A.C.B.; DIAS, C.M.; BASSINI-SILVA, R.; SILVA, E.M.C.; PEREIRA, J.G.; RIBEIRO, L.S. DOS S.; COSTA, A.P. DA; ANDRADE, F.H.E. DE; SILVA, A.L.A.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Molecular detection and characterization of vector-borne agents in common opossums (*Didelphis marsupialis*) from northeastern Brazil. **Acta Tropica**, v.244, p.106955, 2023. DOI: 10.1016/j.actatropica.2023.106955.

BRASIL. Ministério da Saúde. (28 DE OUTUBRO DE 2023). **Sobre o envio de técnicos em saúde a São João del-Rei (MG)**. Em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/canais-de-atendimento/sala-de-imprensa/notas-a-imprensa/2023/sobre-o-envio-de-tecnicos-em-saude-a-sao-joao-del-rei-mg>>. Acesso em: 31 out. 2023.

BROUWER, S.; BARNETT, T.C.; RIVERA-HERNANDEZ, T.; ROHDE, M.; WALKER, M.J. *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization. **FEBS Letters**, v.590, p.3739–3757, 2016. DOI: 10.1002/1873-3468.12254.

CARROLL, D.; WANG, J.; FANNING, S.; MCMAHON, B.J. Antimicrobial Resistance in Wildlife: Implications for Public Health. **Zoonoses and Public Health**, v.62, p.534–542, 2015. DOI: 10.1111/zph.12182.

DOMENECH, M.; GARCÍA, E.; MOSCOSO, M. Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. **Microbial biotechnology**, v.5, p.455–465, 2012. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00294.x.

FARIA, M.B. **Guia dos marsupiais no Brasil: guia de identificação com base em caracteres morfológicos externos e cranianos**. [s.l.] Amélie Editorial, 2019.

FURNESS, L.E.; CAMPBELL, A.; ZHANG, L.; GAZE, W.H.; MCDONALD, R.A. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. **Environmental Research**, v.154, p.28–34, 2017. DOI: 10.1016/j.envres.2016.12.014.

HAAS, B.; GRENIER, D. Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v.48, p.159–166, 2018. DOI: 10.1016/j.medmal.2017.10.001.

HAENNI, M.; LUPO, A.; MADEC, J.-Y. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. **Microbiology Spectrum**, v.6, p.10.1128/microbiolspec.arba-0008–2017, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.arba-0008-2017.

HWANG, A.Y.; GUMS, J.G. The emergence and evolution of antimicrobial resistance: Impact on a global scale. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Discovery of Novel Antibacterials. v.24, p.6440–6445, 2016. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.04.027.

JANSEN, A.M. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas. p. 168-173. Em: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2006. DOI: 10.7476/9788575413869.

KRZYŚCIAK, W.; JURCZAK, A.; KOŚCIELNIAK, D.; BYSTROWSKA, B.; SKALNIAK, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.33, p.499–515, 2014. DOI: 10.1007/s10096-013-1993-7.

LANNES-COSTA, P. S.; OLIVEIRA, J. S. S. DE; SILVA SANTOS, G. DA; NAGAO, P. E. A current review of pathogenicity determinants of *Streptococcus* sp. **Journal of Applied Microbiology**, v.131, p.1600–1620, 2021. DOI: 10.1111/jam.15090.

LUN, Z.-R.; WANG, Q.-P.; CHEN, X.-G.; LI, A.-X.; ZHU, X.-Q. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7, p.201–209, 2007. DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70001-4.

MAGIORAKOS, A.-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p.268–281, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

MALLICOTE, M. Update on *Streptococcus equi* subsp *equi* Infections. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Respiratory Medicine and Surgery. v.31, p.27–41, 2015. DOI: 10.1016/j.cveq.2014.11.003.

MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v.6, p.10.1128/microbiolspec.arba-0009–2017, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017.

MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, M.G. Estreptococcias, p. 317-326. Em: MEGID, J; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. **Rio de Janeiro: Roca**, p. 799-821, 2016.

MITCHELL, A.M.; MITCHELL, T.J. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, p.411–418, 2010. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x.

MOLINARI, G.; CHHATWAL, G.S. Streptococcal invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.56–61, 1999. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80010-1.

MÜHLDORFER, K.; RAU, J.; FAWZY, A.; HEYDEL, C.; GLAESER, S.P.; LINDEN, M. VAN DER; KUTZER, P.; KNAUF-WITZENS, T.; HANCZARUK, M.; ECKERT, A.S.; EISENBERG, T. Streptococcus castoreus, an uncommon group A Streptococcus in beavers. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.112, p.1663–1673, 2019. DOI: 10.1007/s10482-019-01293-5.

MÜHLDORFER, K.; SZENTIKS, C.A.; WIBBELT, G.; LINDEN, M. VAN DER; EWERS, C.; SEMMLER, T.; AKIMKIN, V.; BLOM, J.; RAU, J.; EISENBERG, T. 2020. Streptococcus catagoni sp. nov., isolated from the respiratory tract of diseased Chacoan peccaries (Catagonus wagneri). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.70, p.5734–5739, [s.d.]. DOI: 10.1099/ijsem.0.004471.

MUNITA, J.M.; ARIAS, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**, v.4, p.10.1128/microbiolspec.VMBF-0016–2015, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

NASCIMENTO, C.C.; HORTA, M.C. Didelphimorphia (Gambá e Cuíca), p. 761-788. Em: SILVA, J. C. R.; DIAS, J. L. C.; CUBAS, Z. S. Tratado de animais selvagens. **São Paulo: Roca**, 2006

NOBBS, A.H.; LAMONT, R.J.; JENKINSON, H.F. Streptococcus adherence and colonization. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v.73, p.407–450, Table of Contents, 2009. DOI: 10.1128/MMBR.00014-09.

PERES, M.G.; BACCHIEGA, T.S.; APPOLINÁRIO, C.M.; VICENTE, A.F.; MIONI, M. DE S.R.; RIBEIRO, B.L.D.; FONSECA, C.R.S.; PELÍCIA, V.C.; FERREIRA, F.; OLIVEIRA, G.P.; ABRAHÃO, J.S.; MEGID, J. Vaccinia Virus in Blood Samples of Humans, Domestic and Wild Mammals in Brazil. **Viruses**, v.10, p.42, 2018. DOI: 10.3390/v10010042.

QUINN, P. J. et al. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. **Artmed Editora**, 2005.

RURANGIRWA, F.R.; TEITZEL, C.A.; CUI, J.; FRENCH, D.M.; MCDONOUGH, P.L.; BESSER, T. 2000. Streptococcus didelphis sp. nov., a streptococcus with marked catalase activity isolated from opossums (Didelphis virginiana) with suppurative dermatitis and liver fibrosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.759–765, [s.d.]. DOI: 10.1099/00207713-50-2-759.

- SANTANA, J.A.; COLOMBO, S.A.; SILVA, B.A.; DINIZ, A.N.; ALMEIDA, L.R. DE; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; LOBATO, F.C.F.; SOUZA TRINDADE, G. DE; PAGLIA, A.P.; SILVA, R.O.S. Clostridioides difficile and multi-drug-resistant staphylococci in free-living rodents and marsupials in parks of Belo Horizonte, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.53, p.401–410, 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00640-x.
- SCHALLIG, H.D.F.H.; SILVA, E.S. DA; MEIDE, W.F. VAN DER; SCHOONE, G.J.; GONTIJO, C.M.F. Didelphis marsupialis (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v.7, p.387–393, 2007. DOI: 10.1089/vbz.2006.0651.
- SCHNURRENBERGER, P.R.; BROWN, R.R.; HILL, E.P.; SCANLAN, C.M.; ALTIERE, J.A.; WYKOFF, J.T. Brucella abortus in wildlife on selected cattle farms in Alabama. **Journal of Wildlife Diseases**, v.21, p.132–136, 1985. DOI: 10.7589/0090-3558-21.2.132.
- SERNA, C.; GONZALEZ-ZORN, B. Antimicrobial resistance and One Health. **Revista Española de Quimioterapia**, v.35, p.37–40, 2022. DOI: 10.37201/req/s03.09.2022.
- SPEZIALE, P.; GEOGHEGAN, J.A. Biofilm formation by staphylococci and streptococci: structural, functional, and regulatory aspects and implications for pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.5, p.31, 2015. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00031.
- TAKADA, K.; HAYASHI, K.; SATO, Y.; HIRASAWA, M. 2010. Streptococcus dentapri sp. nov., isolated from the wild boar oral cavity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.820–823, [s.d.]. DOI: 10.1099/ijms.0.012799-0.
- TAURISANO, N.D.; BUTLER, B.P.; STONE, D.; HARIHARAN, H.; FIELDS, P.J.; FERGUSON, H.W.; HAULENA, M.; COTRELL, P.; NIELSEN, O.; RAVERTY, S. STREPTOCOCCUS PHOCAE IN MARINE MAMMALS OF NORTHEASTERN PACIFIC AND ARCTIC CANADA: A RETROSPECTIVE ANALYSIS OF 85 POSTMORTEM INVESTIGATIONS. **Journal of Wildlife Diseases**, v.54, p.101–111, 2018. DOI: 10.7589/2016-09-208.
- TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm Development. **Microbiology Spectrum**, v.3, p.10.1128/microbiolspec.mb-0001–2014, 2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014.
- VELA, A.I.; CASAS-DÍAZ, E.; LAVÍN, S.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.Y. 2015. Streptococcus pharyngis sp. nov., a novel streptococcal species isolated from the respiratory tract of wild rabbits. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.2903–2907, [s.d.]. DOI: 10.1099/ijms.0.000351.
- VELA, A.I.; MENTABERRE, G.; LAVÍN, S.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.Y. 2016. Streptococcus caprae sp. nov., isolated from Iberian ibex (Capra pyrenaica hispanica). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.66, p.196–200, [s.d.]. DOI: 10.1099/ijsem.0.000697.
- WHILEY, R.A.; HARDIE, J.M. Streptococcus. Em: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p.1–86. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00612.